



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Caracterización fenotípica e identificación de especies  
patógenas de *Aeromonas sp.* aisladas de truchas  
arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) clínicamente enfermas  
de piscigranjas del Perú**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Jeferson NUÑURE ORTEGA

**ASESOR**

Nieves Nancy SANDOVAL CHAUPE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Nuñure J. Caracterización fenotípica e identificación de especies patógenas de *Aeromonas* sp. aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) clínicamente enfermas de piscigranjas del Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.

---

## Hoja de Metadatos complementarios

|                                                           |                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Código ORCID del autor                                    | 0000-0002-7178-1778                                                                                                                                                            |
| DNI o pasaporte del autor                                 | 46723476                                                                                                                                                                       |
| Código ORCID del asesor                                   | 0000-0003-0112-9183                                                                                                                                                            |
| DNI o pasaporte del asesor                                | 07011047                                                                                                                                                                       |
| Grupo de investigación                                    | Grupo de Investigación de Sanidad Acuícola: GRISANAC                                                                                                                           |
| Agencia financiadora                                      | Perú. Innóvate Perú:<br>Proyecto N° 078 – INNOVATEPERU – IAPIP – 2017                                                                                                          |
| Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación | Facultad de Medicina Veterinaria,<br>Universidad Nacional Mayor de San Marcos.<br>Av. Circunvalación 28, San Borja 15021<br>Coordenadas geográficas:<br>-12.081698, -76.987703 |
| Año o rango de años en que se realizó la investigación    | Parte experimental: De setiembre 2017 a agosto 2018                                                                                                                            |
| Disciplinas OCDE                                          | Ciencia Veterinaria<br><a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>                                                       |

Nota: tomar en cuenta la forma de llenado según las precisiones señaladas en la web (las tablas OCDE están incluidas).  
[https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion\\_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios\\_30junio.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/archivos/documentos/recepcion_investigacion/Hoja%20de%20metadatos%20complementarios_30junio.pdf)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú, Decana de América  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el **viernes 21 de junio de 2019**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0121-EPMV/FMV-2019**, integrado por los siguientes profesores:

**Dr. Blg. Abelardo Lenin Maturrano Hernández**  
**MV Mg. Nieves Nancy Sandoval Chaupe**  
**MV Mg. Luis Ramiro Luna Espinoza**  
**MV Mg. Juan José Siuce Moreno**

**Presidente de Jurado**  
**Asesora de la Tesis**  
**Miembro del Jurado**  
**Miembro del Jurado**

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **NUÑURE ORTEGA, JEFERSON** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES  
PATÓGENAS DE *Aeromonas* sp. AISLADAS DE TRUCHAS ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) CLÍNICAMENTE ENFERMAS DE PISCIGRANJAS DEL PERÚ”,**

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:10 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:



Firmado digitalmente por  
MATURRANO HERNÁNDEZ  
Abelardo Lenin FAU 20148092282  
soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 11.11.2020 17:32:05 -05:00

Abelardo Lenin Maturrano Hernández: Dr. Blg. Prof. Principal. D.E

Luis Ramiro Luna Espinoza: MV Mg. Prof. Auxiliar. T.C



Firmado digitalmente por SANDOVAL  
CHAUPE Nieves Nancy FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 09.11.2020 14:07:08 -05:00

Nieves Nancy Sandoval Chaupe: MV Mg. Prof. Principal



Firmado digitalmente por SIUCE  
MORENO Juan Jose FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 08.11.2020 20:52:09 -05:00

Juan José Siuce Moreno: MV. Mg. Esp. Prof. Principal. T.C

## DEDICATORIA

*A mis padres y a mis hermanos*

*A mi asesora y a mis maestros*

*A todos mis buenos amigos*

*A mi inolvidable Nenush*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Fermina y Álvaro, por todo su cariño, por educarme y aconsejarme a lo largo de mi vida personal y académica, además de enseñarme a querer las costumbres de los pueblos en donde ellos nacieron: Huánuco y Arequipa.

A mi hermana Sofía por su generosidad y apoyo constante en mi educación, a mi hermano Manuel por inculcarme el deseo de seguir aprendiendo diversos aspectos de la cultura.

A todo el grupo humano del Laboratorio de Ictiopatología de mi querida facultad, en especial a la Dra. Nieves y al Dr. Manchego, por ilustrarme con sus enseñanzas, además de demostrarme su infinita amabilidad y comprensión.

A todos los amigos que hice en las diferentes etapas de mi vida, en especial a Mauro, Juan, Felipe, Adhemir, Gina y Marisol, gracias por hacer más sencilla la realización de esta tesis y por su amistad.

A Innovate -Perú por permitir la subvención, la capacitación y el desarrollo de esta tesis mediante la ejecución del Proyecto N° 078 – INNOVATEPERU – IAPIP – 2017.

## INDICE

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMEN.....                                                       | vii |
| ABSTRACT.....                                                      | vii |
| LISTA DE CUADROS.....                                              | ix  |
| LISTA DE FIGURAS.....                                              | x   |
| LISTA DE ANEXOS.....                                               | xi  |
| LISTA DE SIGLAS.....                                               | xii |
| I. INTRODUCCIÓN.....                                               | 1   |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....                                    | 2   |
| 2.1. SITUACION ACTUAL DE LA ACUICULTURA.....                       | 2   |
| 2.1.1. Actualidad de la Acuicultura en el Mundo.....               | 2   |
| 2.1.2. Actualidad del Sector Acuícola en Latinoamérica y Perú..... | 3   |
| 2.1.3. Situación de la Acuicultura Nacional.....                   | 4   |
| 2.1.4. Producción y Exportación Acuícola.....                      | 4   |
| 2.1.5. Situación de la Producción de Trucha arcoíris.....          | 7   |
| 2.2. TRUCHA ARCOIRIS.....                                          | 9   |
| 2.2.1. Antecedentes históricos.....                                | 9   |
| 2.2.2. Clasificación taxonómica.....                               | 10  |
| 2.2.3. Rasgos físicos.....                                         | 10  |
| 2.2.4. Parámetros físico-químicos óptimos del agua.....            | 11  |
| 2.3. AEROMONIASIS.....                                             | 13  |
| 2.3.1. <i>Aeromonas</i> : Características y taxonomía.....         | 13  |
| 2.3.2. Factores de virulencia.....                                 | 14  |
| 2.3.3. <i>Aeromonas</i> patógenas en salmónidos.....               | 16  |
| 2.3.3.1. <i>Aeromonas salmonicida</i> y Forunculosis.....          | 16  |
| 2.3.3.2. <i>Aeromonas hydrophila</i> y MAS.....                    | 18  |



|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.3.3. Otras <i>Aeromonas</i> de importancia.....         | 19 |
| 2.3.4. Aeromoniasis: signología y patogenia.....            | 19 |
| 2.3.4.1. Forunculosis.....                                  | 19 |
| 2.3.4.2. Septicemia por <i>Aeromonas</i> Móviles (MAS)..... | 20 |
| 2.3.5. Susceptibilidad y rango de hospederos.....           | 21 |
| 2.3.6. Identificación.....                                  | 22 |
| 2.3.6.1. Caracterización fenotípica.....                    | 22 |
| 2.3.6.2. Identificación molecular y filogenética.....       | 22 |
| 2.3.7. Control y prevención.....                            | 23 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS.....                              | 24 |
| 3.1. Lugar de Estudio.....                                  | 24 |
| 3.2. Material biológico.....                                | 24 |
| 3.3. Tamaño de muestra.....                                 | 24 |
| 3.4. Metodología.....                                       | 25 |
| 3.4.1. Toma de muestras biológicas.....                     | 25 |
| 3.4.2. Siembra y cultivo bacteriano.....                    | 25 |
| 3.4.3. Caracterización de colonias.....                     | 26 |
| 3.4.4. Caracterización bioquímica.....                      | 26 |
| 3.5. Identificación con técnicas moleculares.....           | 27 |
| 3.5.1. Identificación por PCR.....                          | 27 |
| 3.5.2. Secuenciación y BLAST.....                           | 28 |
| 3.6. Preservación de las cepas.....                         | 28 |
| IV. RESULTADOS.....                                         | 29 |
| 4.1. Presencia de signos clínicos y lesiones.....           | 29 |
| 4.2. Caracterización fenotípica.....                        | 30 |
| 4.2.1. Caracterización preliminar.....                      | 30 |

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| 4.2.2. Caracterización bioquímica..... | 32 |
| 4.3. Identificación molecular.....     | 33 |
| 4.4. Análisis de los resultados.....   | 35 |
| V. DISCUSIÓN.....                      | 36 |
| VI. CONCLUSIONES.....                  | 40 |
| VII. REFERENCIAS.....                  | 41 |
| VIII. ANEXOS.....                      | 53 |

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la caracterización bioquímica e identificación molecular de cepas patógenas *Aeromonas* sp., aisladas de truchas arcoíris juveniles con signología compatible a Aeromoniasis cultivadas en 6 piscigranjas de Junín (2), Pasco (2), Cajamarca (1) y Áncash (1). Se seleccionó 60 truchas juveniles de 4 a 5 meses, con signología sugerente de brotes de aeromoniasis (comportamiento anómalo, úlceras epiteliales, melanosis, necrosis y hemorragias en aletas y distensión abdominal), procedentes de piscigranjas de Junín (20), Pasco (20), Cajamarca (12) y Áncash (8), recolectados entre los años 2017 y 2018. Se realizó la eutanasia, la necropsia y se registró los signos clínicos como lesiones externas e internas. Se efectuó el aislamiento bacteriano de muestras de bazo y riñón anterior en agar TSA y GSP por 24-48 horas a 25°C, se caracterizó las colonias bacterianas mediante pruebas bioquímicas, se identificó por PCR convencional utilizando *primers* específicos del gen ARNr 16S (*Aeromonas* spp.), *fstA* (*A. salmonicida*) y *gyrB* (*A. hydrophila*), se realizó la secuenciación y se confirmó por análisis BLAST (NCBI). Las lesiones externas registradas fueron melanosis, aletas necróticas y hemorrágicas, úlceras en la piel y distensión abdominal. Las lesiones internas observadas fueron hepatomegalia, esplenomegalia y hemorragia petequial en hígado, ciegos pilóricos y grasa peritoneal. Se aisló 12 cepas bacterianas en el medio selectivo GSP (7 de Junín y 5 de Cajamarca), caracterizadas como *Aeromonas* spp.: cocobacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos. No se aisló *Aeromonas* spp. en las muestras de Pasco y Ancash. Las pruebas bioquímicas determinaron 4 cepas como *Aeromonas salmonicida* y 8 como *Aeromonas* sp. móviles, diferenciándose por pruebas de motilidad e indol. La identificación molecular por PCR determinó 4 cepas *A. salmonicida* procedentes de Junín, 1 cepa *A. hydrophila* de Cajamarca y 7 cepas móviles *Aeromonas* spp. (3 de Junín y 4 de Cajamarca) que fueron negativas a la PCR de *A. salmonicida* y *A. hydrophila*. El análisis BLAST (NCBI) confirmó las cepas *A. salmonicida* y *Aeromonas* spp. ya que presentaron identidad de 98 a 100%, además demostró que la cepa de Cajamarca (identificada como *A. hydrophila* por bioquímica) presentaba identidad de 95,65% con *Aeromonas hydrophila* subespecie *dhakensis*. En conclusión, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* subespecie *dhakensis* y otras *Aeromonas* móviles patógenas causan signología asociada a aeromoniasis en truchas arcoiris juveniles en las piscigranjas de Junín y Cajamarca. Es la primera vez que se detecta *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* en el país.

**Palabras clave:** *Aeromonas*, *Oncorhynchus mykiss*, pruebas bioquímicas, PCR, Perú.

## ABSTRACT

The aim of the present study was the biochemical characterization and molecular identification of *Aeromonas* sp. pathogenic strains isolated from juvenile rainbow trout with signology associated to *Aeromonas* infection and reared in 6 fish farms from Junín (2), Pasco (2), Cajamarca (1) and Ancash (1). Sixty 4- to 5-month-old juvenile trout were selected, with signology associated to *Aeromonas* infection outbreaks (abnormal behavior, skin ulcers, melanosis, necrosis and hemorrhages in fins and abdominal distension), coming from fish farms from Junín (20), Pasco (20), Cajamarca (12) and Ancash (8), collected between 2017 and 2018. Euthanasia, necropsy and clinical signs (external and internal lesions) were recorded. Bacterial isolation of spleen and head kidney samples on TSA and GSP agar was performed for 24-48 hours at 25°C, bacterial colonies were characterized by biochemical tests, conventional PCR and specific *primers* were used to identify the 16S rRNA (*Aeromonas* spp.), *fstA* (*A. salmonicida*) and *gyrB* gene (*A. hydrophila*), sequencing and confirmation by BLAST analysis (NCBI) were performed. The external injuries recorded were melanosis, necrotic and hemorrhagic fins, skin ulcers and abdominal distension. The internal injuries observed were hepatomegaly, splenomegaly and petechial hemorrhage in the liver, pyloric caeca and peritoneal fat. Twelve (12) bacterial strains were isolated in the selective medium GSP agar (7 strains from Junin and 5 from Cajamarca) and characterized as *Aeromonas* spp.: Gram negative coccobacilli, oxidase and catalase positive. No *Aeromonas* spp. was isolated in the Pasco and Ancash samples. Biochemical tests determined 4 strains as *Aeromonas salmonicida* and 8 as motile *Aeromonas* sp. (differing in motility and indole tests). Molecular identification by PCR determined 4 *A. salmonicida* strains from Junin, 1 *A. hydrophila* strain from Cajamarca and 7 motile *Aeromonas* spp. strains (3 strains from Junin and 4 from Cajamarca), the latter were negative to PCR test for *A. salmonicida* and *A. hydrophila*. BLAST analysis (NCBI) confirmed *A. salmonicida* and *Aeromonas* spp. strains since they presented 98 to 100% query coverage, in addition, the Cajamarca strain (identified as *A. hydrophila* by biochemical tests) presented 95.65% query coverage with *Aeromonas hydrophila* subspecies *dhakensis*. In conclusion, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* subspecies *dhakensis* and other pathogenic motile *Aeromonas* cause signology associated to *Aeromonas* infection in juvenile rainbow trout from fish farms from Junín and Cajamarca. It is the first time that *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* is detected in the country.

**Keywords:** *Aeromonas*, *Oncorhynchus mykiss*, Biochemical tests, PCR, Peru.

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Producción de especies hidrobiológicas derivada del sector acuícola nacional según ámbito y especie, 2012-2016 (TM) (Cuadro modificado de PRODUCE, 2018).

**Cuadro 2.** Producción de trucha arcoíris en Toneladas Métricas (TM), por región del Perú en el periodo 2011-2016 (Cuadro modificado de FONDEPES, 2017).

**Cuadro 3.** Rangos óptimos del ambiente acuático a tomarse en cuenta en el cultivo de la trucha (Cuadro modificado de RAGASH, 2009).

**Cuadro 4.** Pruebas bioquímicas realizadas para caracterizar las principales *Aeromonas* sp.

**Cuadro 5.** Detalles de los *primers* usados para la detección de *A. salmonicida* y *A. hydrophila*

**Cuadro 6.** Frecuencia de alteraciones patológicas macroscópicas observadas tras la necropsia de las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

**Cuadro 7.** Caracterización preliminar de los aislados presuntivos a *Aeromonas* sp. obtenidos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) enfermas de Junín y Cajamarca.

**Cuadro 8.** Caracterización bioquímica de cepas *Aeromonas* sp. aisladas de las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles y clínicamente enfermas de Junín.

**Cuadro 9.** Caracterización bioquímica de cepas *Aeromonas* sp. aisladas de las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles y clínicamente enfermas de Cajamarca.

**Cuadro 10.** Frecuencia de las cepas del género *Aeromonas* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles, clínicamente enfermas de Junín y Cajamarca.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Producción acuícola mundial de peces comestibles y plantas acuáticas en el período 1990-2016 (FAO, 2018).

**Figura 2.** Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie, 2016 (PRODUCE, 2018)

**Figura 3.** Exportación de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie, 2016 (PRODUCE, 2018)

**Figura 4.** Progreso de la producción de la trucha arcoíris en el Perú entre los años 2011-2016 (Gráfico modificado de FONDEPES, 2017).

**Figura 5.** Distribución global de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como especie nativa y como especie introducida en el periodo 1870 -2007 (Crawford y Muir, 2008).

**Figura 6.** Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

**Figura 7.** Colonias de *Aeromonas salmonicida* en agar TSA exhibiendo pigmento marrón (izquierda). Colonias de *Aeromonas* sp. en agar GSP (derecha).

**Figura 8.** Lesiones externas de truchas arcoíris: úlceras en la piel, lesiones necro-hemorrágicas y distensión abdominal.

**Figura 9.** Lesiones encontradas a la necropsia. Hepatomegalia, hemorragia petequiral en hígado, ciegos pilóricos y a nivel de grasa peritoneal.

**Figura 10.** Electroforesis de producto de PCR de aislados *Aeromonas* sp. Columna 1 y 16: Ladder; Columna 3 - 14: aislados; Columna 2: control positivo; Columna 3: control negativo.

**Figura 11.** Electroforesis de producto de PCR (A) de *A. salmonicida*: Columna 4 – 7 y (B) de *A. hydrophila*: Columna 5. Ladder: Columna 1 (A) y 7 (B); NTC: Columna 3 (A) y 6 (B).

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Reporte de las lesiones macroscópicas visualizadas en la necropsia de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles clínicamente enfermas de piscigranjas de 4 regiones del Perú, periodo 2017 - 2018.

**Anexo 2.** Descripción de los aislados bacterianos obtenidos de bazo (B) y riñón anterior (R) de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles clínicamente enfermas originarias de piscigranjas de 4 regiones del Perú, periodo 2017 - 2018.

**Anexo 3.** Protocolo de PCR convencional

## LISTA DE SIGLAS

- ADH Arginina deshidrogenasa
- CAT Catalasa
- CIT Citrato
- Fw *Primer o cebador Forward*
- GEL Degradación de Gelatina
- GLU Degradación de Glucosa
- GM Tinción Gram
- GSP Glutamate Starch Phenol Agar
- H<sub>2</sub>S Sulfuro de hidrógeno
- HE $\beta$  Hemólisis beta  $\beta$
- IND Indol
- LAC Degradación de Lactosa
- LDC Lisina descarboxilasa
- MAN Degradación de Manitol
- MAS Motile *Aeromonas* Septicemia
- MOT Motilidad
- NIT Reducción de nitrato
- ODC Ornitina descarboxilasa
- OX Oxidasa
- PM Pigmento marrón
- PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
- Rv *Primer o cebador Reverse*
- SIM Sulfuro-Indol-Motilidad
- TSA Agar de soja trípica
- URE Urea



## I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el sector de producción de alimentos más creciente a nivel mundial. En el Perú, los principales recursos acuícolas son la trucha arcoíris, los langostinos y las conchas de abanico (FAO, 2018; PRODUCE, 2018). Una patología que afecta el cultivo de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es la aeromoniasis, la cual es ocasionada por bacterias del género *Aeromonas* sp., provoca retraso en el crecimiento, mortalidad de peces y perjuicios económicos significativos (Zepeda-Velásquez, 2015b). Las principales especies patógenas involucradas en la aeromoniasis son: *Aeromonas salmonicida*, agente etiológico de la forunculosis, y *Aeromonas hydrophila*, patógeno principal en la Septicemia por *Aeromonas* Móviles (MAS) (Cipriano, 2001; Janda y Abbott, 2010). En nuestra nación, se aislaron diferentes cepas de *Aeromonas*, así IMARPE (2008) y Baca (2012) aislaron *A. salmonicida* y *A. hydrophila* provenientes de truchas arcoíris clínicamente enfermas de piscigranjas de Junín. Al ser un problema sanitario constante, en el Perú, el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) incluyó la aeromoniasis dentro del Programa de Control de Enfermedades en Animales Acuáticos (SANIPES, 2016). Las bacterias patógenas *Aeromonas* sp. son cocobacilos gramnegativos que producen una signología que incluye nado errático, letargia e inapetencia, melanosis, lesiones externas (ulceraciones, lesiones necro-hemorrágicas de aletas y distensión abdominal) e internas (septicemia y hemorragia en diversos órganos) (Noga, 2010). Las investigaciones previas sobre *A. salmonicida* en truchas realizaron aislamiento y caracterización bioquímica de las cepas; sin embargo, aún no se identificó molecularmente *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y otras *Aeromonas* sp. patógenas. La diversidad fenotípica y genética de estos patógenos (Cipriano, 2001) reafirma la necesidad de realizar más estudios para controlarlos y prevenirlos. Debido a los estudios previos en el país se realizó la caracterización e identificación de *Aeromonas* sp. patógenas de truchas arcoíris de Junín, Pasco, Cajamarca y Áncash; y así comprender la signología y la importancia sanitaria de la aeromoniasis.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA**

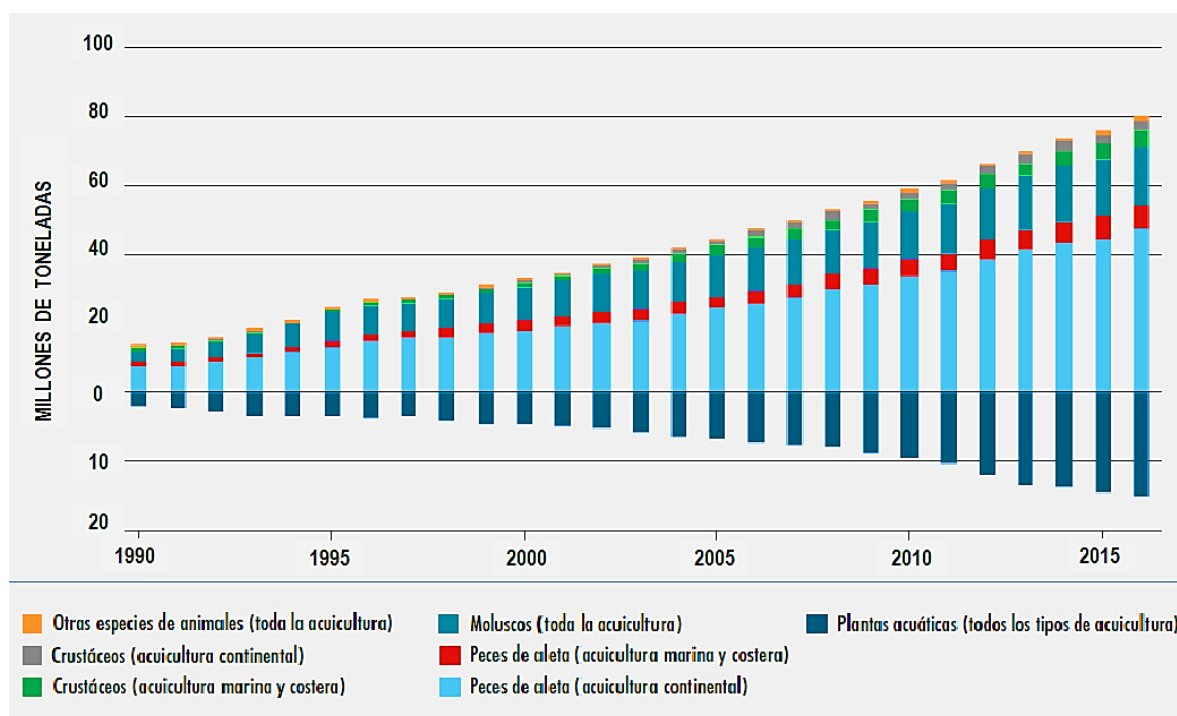
#### **2.1.1. Actualidad de la Acuicultura en el Mundo**

La acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos como peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas en zonas marinas y continentales. El cultivo implica la mediación humana en el desarrollo del espécimen a criar acrecentando su producción, como el confinamiento, la nutrición, la reproducción, el cuidado contra predadores, etc. Para propósitos estadísticos y a fin de diferenciarla con la pesca, los organismos acuáticos que son cosechados en su fase de crianza aportan cifras a la acuicultura, entretanto las especies acuáticas explotables por la población son recursos de propiedad colectiva y forman parte de la pesca (FAO, 2008).

La producción acuícola en general fue de 110,2 MMT (millones de toneladas) en el año 2016, lo que superó la estimación del volumen de producción de años precedentes. Se obtuvo 80,0 MMT de peces comestibles y 30,1 MMT de plantas acuáticas (Figura 1). Además se reportó la producción de peces comestibles (54,1 MMT), moluscos (17,1 MMT), crustáceos (7,9 MMT), y otros animales acuáticos (0,9 MMT). Para completar los datos estadísticos se registró el cultivo de plantas acuáticas (algas marinas y microalgas) y productos no alimentarios (conchas ornamentales y perlas). Siendo Asia (la producción de China en el 2016 alcanzó el 62% del sector acuicultor) el mayor productor a nivel mundial (FAO, 2018).

El crecimiento de la población mundial aumenta la demanda de productos hidrobiológicos, la cual ya no puede ser abastecida completamente por la captura de peces efectuada por la producción pesquera ya que ésta ha alcanzado su máximo potencial de extracción. La acuicultura es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento global ya que se desarrolla y se

expande en casi la totalidad del mundo además de tener un rol muy importante en el desarrollo sostenible de las naciones. Este es el motivo por la que la acuicultura ha pasado a satisfacer gradual y parcialmente la demanda mundial de recursos hidrobiológicos llegando a contribuir el 46,8% de la producción mundial de pesca y acuicultura en el año 2016 (Subasinghe *et al.*, 2009; FAO, 2018).



**Figura 1.** Producción acuícola mundial de peces comestibles y plantas acuáticas en el período 1990-2016 (FAO, 2018).

### 2.1.2. Actualidad del Sector Acuícola en Latinoamérica y Perú

En el año 2016 los países de Latinoamérica generaron alrededor del 4.2% de la producción acuícola global, pero aún es muy bajo comparado al continente asiático. El 90% (2,1 millones de toneladas) de la acuicultura latinoamericana se debió a Chile, Brasil y Ecuador, siendo el principal recurso acuícola chileno, los salmónidos y en el caso ecuatoriano, los langostinos. Mientras tanto, la aún poco tecnificada producción acuícola del Perú representó apenas el 4% a nivel regional, no obstante, en el último decenio la acuicultura nacional creció 13% gracias al auge productivo de sus principales recursos: la trucha arcoíris, la concha de abanico y los langostinos (FAO, 2016).

### **2.1.3. Situación de la Acuicultura Nacional**

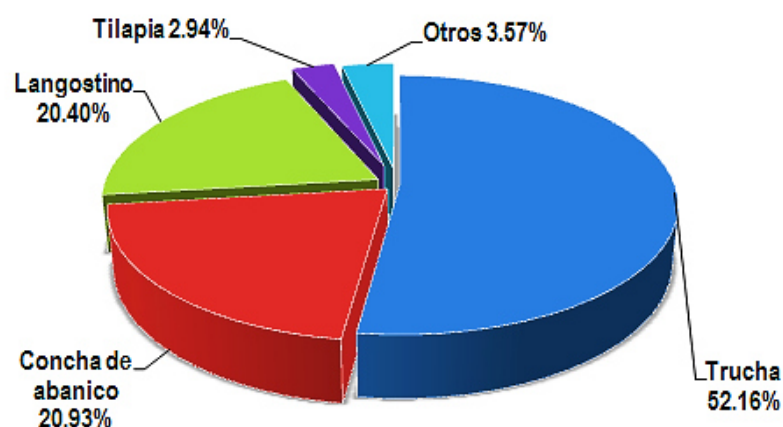
El Perú presenta características climáticas e hidrológicas que le confieren un gran potencial para el desarrollo de la acuicultura tanto marina como continental, además de poseer numerosos recursos hidrobiológicos y disponer de insumos necesarios para la elaboración de piensos para peces de cultivo, como la harina de pescado (el Perú es uno de los principales productores a nivel mundial). Así, en el periodo 2004-2016, el sector acuícola pasó de producir 25,9 miles de TM hasta alcanzar 100,2 miles de TM, de estas últimas cifras se sabe que el 58,7% se debió a la acuicultura continental y 41,3% a la maricultura (PRODUCE, 2018).

Para realizar una actividad acuícola se precisa el otorgamiento de derechos que son obtenidos mediante la modalidad de “concesión” (área continental o marina de dominio público) o mediante “autorización” (áreas privadas). Según el “Plan Nacional de Desarrollo Acuícola 2010-2021” el litoral peruano es ideal para el cultivo de macroalgas y conchas de abanicos entretanto las áreas continentales son aptas para la producción de tilapia, trucha y especies amazónicas. Sin embargo, pese al incremento de las áreas habilitadas sólo se trabaja en 28,8% de estas (PRODUCE, 2016).

Uno de los problemas es la escala de producción ya que la mayoría desarrolla una producción de subsistencia (menor a 2 Toneladas Métricas por año) y de menor escala (de 2 a 50 TM por año), lo que contrasta con la maricultura que presenta mayormente producción de mayor escala (mayor a 50 TM). La acuicultura continental brinda empleo a tres veces más personas que la maricultura siendo asociado más al consumo familiar y al comercio interno, entretanto los productos de la maricultura se destina mayormente a la exportación con mayor valor agregado. Otros problemas del sector son la informalidad, la precaria innovación tecnológica y la poca organización entre los productores y las entidades gubernamentales (Mendoza, 2013).

### **2.1.4. Producción y Exportación Acuícola**

En el año 2016, la acuicultura continental cultivó: trucha, boquichico, camarón gigante de Malasia, carachama, carpa, gamitana, paco, pacotana, paiche, sábalo, tilapia; mientras que la maricultura produjo conchas de abanico, langostino, algas y lenguado (Cuadro 1). El 93,4% de la producción acuícola nacional se debe principalmente a tres especies: trucha arcoíris (52,1%), concha de abanico (20,9%) y langostinos (20,4%). La tilapia representó el 2,9% y las demás especies sólo el 3,7% (Figura 2). Además, en el año 2016, se observó un incremento del 10,1% en la cosecha con respecto a los datos del año 2015 (PRODUCE, 2018).



**Figura 2.** Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie, 2016 (PRODUCE, 2018).

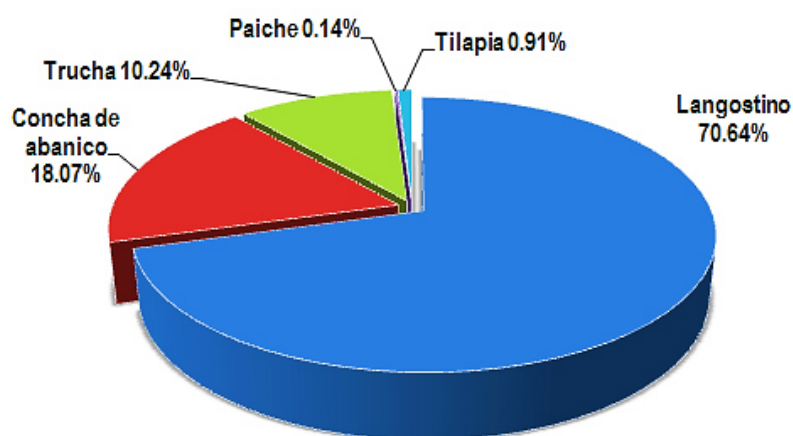
**Cuadro 1.** Producción de especies hidrobiológicas derivada del sector acuícola nacional según ámbito y especie, 2012-2016 (TM) (Cuadro modificado de PRODUCE, 2018).

| Ámbito / Especie           | 2012          | 2013           | 2014           | 2015          | 2016           |
|----------------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| <b>T o t a l</b>           | <b>72 293</b> | <b>125 693</b> | <b>115 269</b> | <b>90 976</b> | <b>100 191</b> |
| <b>Ríos y lagos</b>        | 29 564        | 40 068         | 38 683         | 45 758        | 58 771         |
| Boquichico                 | 35            | 56             | 6              | 9             | 31             |
| Camarón Gigante de Malasia | 11            | 20             | 78             | 21            | 34             |
| Carachama                  | 7             | 10             | 5              | 4             | 9              |
| Carpa                      | 19            | 6              | 2              | 4             | 4              |
| Gamitana                   | 453           | 531            | 504            | 299           | 1863           |
| Paco                       | 299           | 443            | 453            | 825           | 1390           |
| Pacotana                   | 17            | 15             | 9              | 219           | 11             |
| Paiche                     | 637           | 94             | 55             | 135           | 142            |
| Tilapia                    | 3 174         | 3 840          | 4 610          | 3 250         | 2 950          |
| Trucha                     | 24 762        | 34 992         | 32 923         | 40 946        | 52 245         |
| Sábalo                     | 46            | 58             | 37             | 33            | 87             |
| Otras especies             | 102           | 3              | 1              | 12            | 4              |
| <b>Mar</b>                 | <b>42 730</b> | <b>85 625</b>  | <b>76 586</b>  | <b>45 218</b> | <b>41 420</b>  |
| Especies de Algas          | 146           | 44             | 3              | 2             | 1              |
| Concha de Abanico          | 24 782        | 67 694         | 55 096         | 23 029        | 20 975         |
| Langostino                 | 17 801        | 17 883         | 21 484         | 22 183        | 20 441         |
| Lenguado                   | 1             | 3              | 3              | 4             | 3              |
| Ostra del Pacífico         | -             | -              | -              | -             | -              |
| Otras especies             | -             | -              | -              | 1             | 0              |

La producción de trucha crece de forma sostenida en las regiones trucheras de Puno, Huancavelica y Junín. El espécimen que se cultiva es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Es la principal especie del sector acuícola que se comercializa en el mercado interno y abarca el 86,1% de este rubro. El auge exportador de truchas para consumo (37,5% más entre los años 2015-2016), considerando sólo especies acuícolas, ocupa el tercer lugar abarcando el 10,2% del sector con una producción de 2908,3 TMB (Tonelada Métrica Bruta) y sus principales destinos son Estados Unidos (EE. UU.) y Canadá (Saldarriaga y Regalado, 2017; PRODUCE, 2018).

La concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) es el recurso de la acuicultura que presentó más fluctuaciones en volumen exportable en la última década debido a problemas ambientales como el Fenómeno de El Niño y por problemas de inocuidad alimentaria. En el periodo 2015-2016, el volumen exportable se redujo en 30,1%, produciendo solo 5132,5 TMB (lo que representa el 18,0% del total de la exportación de recursos acuícolas), siendo sus principales destinos Francia, España y Bélgica (Mendoza, 2013; PRODUCE, 2018).

Según datos del 2016, la producción de langostinos (la especie cultivada en el Perú es el *Litopenaeus vannamei*) generó el 70,6% de toda la producción acuícola destinada a la exportación, con un volumen total de 20 062,4 TMB. Pese a registrar una pérdida de 20,2% con respecto al año 2015, generó ingresos por 130,0 millones US\$ superando a las especies *A. purpuratus* y *O. mykiss* que generaron 77,3 y 20,4 millones US\$ respectivamente (Figura 3). Los principales países de destino son Estados Unidos y España, en estos mercados el kilogramo de langostino congelado obtuvo un precio relativo de 7,2 a 9,3 US\$ el año 2017 (PRODUCE, 2018; PROMPERU, 2018).



**Figura 3.** Exportación de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie, 2016 (PRODUCE, 2018).

En el año 2016, la tilapia (*Oreochromis spp.*) y el paiche (*Arapaima gigas*) presentaron una participación reducida pero destacable en el rubro de exportación. El volumen exportado de tilapia fue de 257,4 TMB y el de paiche, 38,99 TMB generando 1,8 millones US\$ y 447 mil US\$ respectivamente, siendo Estados Unidos el principal mercado. Es necesario mencionar que a finales del año 2017, se detectó la presencia del Virus de la Tilapia Lacustre (TILV) en el Perú, agente patógeno que generó alta mortalidad y cuantiosas pérdidas a la producción de tilapias, poniendo en alerta el estatus sanitario acuícola nacional (PRODUCE, 2018; SANIPES, 2018).

#### **2.1.5. Situación de la Producción de Trucha arcoíris**

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se introdujo al Perú en 1928 con fines deportivos, luego se sembró a 2000 msnm, se cultivó en pozas hechas en tierra o de concreto (llamados *raceways*) en ríos, y en jaulas de metal o artesanales sobre lagos altoandinos. El proceso productivo presenta las siguientes etapas de cultivo: siembra, alevinaje (3 meses), juvenil (2 meses), engorde y cosecha (2 a 3 meses). El último decenio presentó un crecimiento promedio anual constante de 21%; desarrollándose ampliamente en el lago Titicaca en Puno, región que ostenta el 80% de la producción nacional. (FONDEPES, 2006; FONDEPES, 2014).

Según datos del 2016 la región truchera más productiva del Perú es Puno (43 298 TM), seguida por Huancavelica (3 704 TM) y por Junín (2 263 TM). La producción por región se muestra en el cuadro 2. Los derechos otorgados para el cultivo de trucha arcoíris en el 2016 son 1165 autorizaciones (36,82% son de “menor a escala” y 35,88% son de “subsistencia”) y 1063 concesiones (73,28% son de “menor escala” y 18,44% son de “acuicultura de micro y pequeña empresa (AMYPE)”, en ambos casos solo 2 son de “mayor escala” (FONDEPES, 2017).

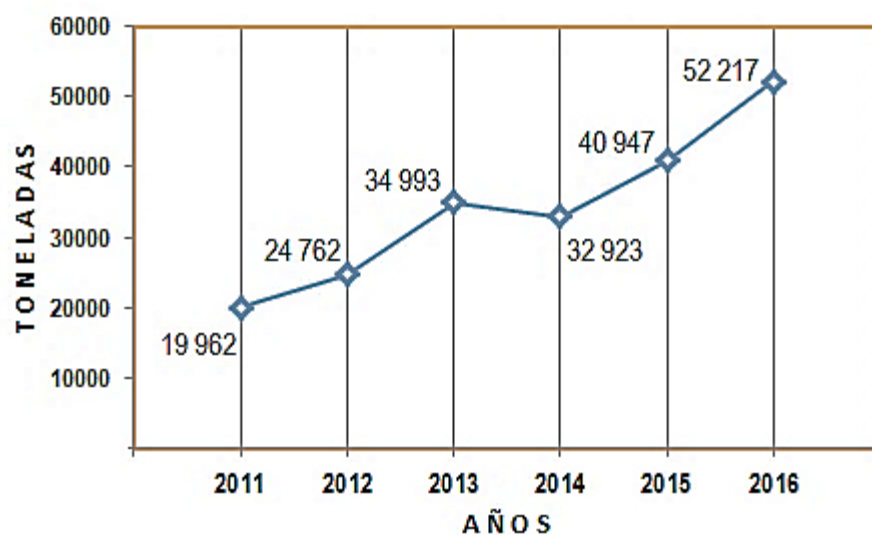
A nivel mundial la producción total de truchas arcoíris en el periodo 2011-2016, tuvo un promedio de producción de 812 130 TM. En la figura 4 se observa las fluctuaciones de la producción mundial de truchas (2011-2016). El año 2012 obtuvo el mayor registro con 883 463 TM, sin embargo en los siguientes años la producción disminuyó. Para el año 2016 se estimó una producción de 814 455 TM gracias al 5,8% de crecimiento anual para la acuicultura según el “Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura 2016” de la FAO (FAO, 2016; FONDEPES, 2017).

En el año 2016, el Perú ocupó el quinto lugar en el ranking mundial de productores de trucha arcoíris con una producción de 52 217 TM lo que equivale al 6,41% del total. Además ocupa el segundo lugar de producción en el continente americano (25,97%) sólo por debajo de Chile (49,83%). A nivel global, el país líder es Irán con 148 789 TM (18,27%), le siguen Turquía con 112

781 TM (13,85%), Chile con 100 211 TM (12,30%), Noruega con 77 751 TM (9,47%). Luego están Perú, Francia (4,74%) y Dinamarca (4,20%) (FAO, 2016; FONDEPES, 2017).

**Cuadro 2.** Producción de trucha arcoíris en Toneladas Métricas (TM), por región del Perú en el periodo 2011-2016 (Cuadro modificado de FONDEPES, 2017).

| Posición          | Región       | 2011          | 2012          | 2013          | 2014          | 2015          | 2016          |
|-------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1                 | Puno         | 15 550        | 18 472        | 29 093        | 28 243        | 34 124        | 43 298        |
| 2                 | Huancavelica | 1 122         | 1 144         | 1 222         | 1 444         | 3 387         | 3 704         |
| 3                 | Junín        | 1 967         | 3 413         | 2 127         | 1 615         | 1 178         | 2 263         |
| 4                 | Cusco        | 252           | 438           | 641           | 170           | 637           | 798           |
| 5                 | Ayacucho     | 209           | 240           | 265           | 304           | 483           | 544           |
| 6                 | Lima         | 83            | 128           | 197           | 220           | 253           | 344           |
| 7                 | Amazonas     | 25            | 61            | 41            | 36            | 81            | 291           |
| 8                 | Huánuco      | 110           | 148           | 198           | 269           | 259           | 247           |
| 9                 | Pasco        | 122           | 90            | 88            | 89            | 128           | 234           |
| 10                | Cajamarca    | 294           | 329           | 328           | 175           | 75            | 139           |
| 11                | La Libertad  | 7             | 9             | 10            | 49            | 122           | 120           |
| 12                | Apurímac     | 27            | 38            | 50            | 60            | 75            | 98            |
| 13                | Ancash       | 128           | 136           | 659           | 82            | 79            | 86            |
| 14                | Tacna        | 21            | 48            | 21            | 68            | 30            | 33            |
| 15                | Arequipa     | 44            | 62            | 43            | 91            | 29            | 19            |
| 16                | Moquegua     | 1             | 6             | 11            | 8             | 8             | 0             |
| <b>TOTAL (TM)</b> |              | <b>19 962</b> | <b>24 762</b> | <b>34 993</b> | <b>32 923</b> | <b>40 947</b> | <b>52 217</b> |



**Figura 4.** Progreso de la producción de la trucha arcoíris en el Perú entre los años 2011-2016 (Gráfico modificado de FONDEPES, 2017).



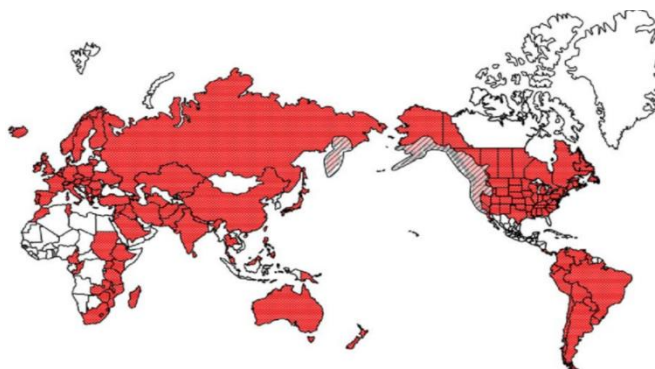
El desarrollo de la actividad truchícola peruana está ligada a la masiva importación de ovas embrionadas que registró unos 225 millones en el año 2016 provenientes principalmente de países como Estados Unidos (52%), España (30%), Dinamarca (10%), Gran Bretaña (7%) y Chile (1%). Para el 2021, la Dirección General de Acuicultura estima que se precisarán 330 millones de ovas embrionadas, por esta razón el Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA) promueve proyectos para la producción de ovas y alevines (FONDEPES, 2017).

## 2.2. TRUCHA ARCOIRIS

### 2.2.1. Antecedentes históricos

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es un salmónido carnívoro nativo de las cuencas del Pacífico de América del Norte, introducida en todos los continentes desde 1874 (excepto la Antártica) para ser usada en la pesca deportiva y como recurso de la acuicultura. En 1950, su producción se vio enormemente favorecida gracias al auge de los alimentos peletizados y actualmente su cultivo prospera en Europa, América del Norte y en diversas cuencas altiplánicas de países de Asia, África y América del Sur (figura 5) (FAO, 2005; Crawford y Muir, 2008).

En el año 1928, el Perú inició la introducción y cultivo de truchas mediante la compra de ovas embrionadas importadas desde los Estados Unidos, estas se instalaron en un criadero cercano al río Tishgo, situado en La Oroya, región Junín, posteriormente se distribuyó a ríos y lagunas de Junín y Pasco (Ragash, 2009). En el año 1977, el Ministerio de Pesquería dispuso la crianza en jaulas flotantes con buenos resultados. En la actualidad, la truchicultura, mediante el desarrollo de técnicas de cultivo y de innovaciones tecnológicas, permite producir alimentos de alto valor nutricional además de promover el desarrollo socioeconómico. (Yapuchura, 2006; FAO, 2010).



**Figura 5.** Distribución global de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como especie nativa y como especie introducida en el periodo 1870 -2007 (Crawford y Muir, 2008).

### 2.2.2. Clasificación taxonómica

La trucha arcoíris recibe los siguientes nombres comunes: “rainbow trout” en inglés y “truite arc-en-ciel” en francés. Según datos de CABI (Invasive Species Compendium) (2018) basados en la reclasificación de la especie publicada por Smith y Stearley en el año 1989 se tiene la siguiente clasificación taxonómica:

|                  |   |                            |
|------------------|---|----------------------------|
| <b>Reino</b>     | : | Animalia                   |
| <b>Phylum</b>    | : | Chordata                   |
| <b>Subphylum</b> | : | Vertebrata                 |
| <b>Clase</b>     | : | Actinopterygii             |
| <b>Orden</b>     | : | Salmoniformes              |
| <b>Familia</b>   | : | Salmonidae                 |
| <b>Género</b>    | : | Oncorhynchus               |
| <b>Especie</b>   | : | <i>Oncorhynchus mykiss</i> |

Originalmente, fue denominada *Salmo mykiss* por Walbaum en 1792, luego fue llamada *Salmo gairdneri* por Richardson, quien obtuvo peces del río Columbia en Fort Vancouver en 1836 (Behnke, 1992). Por muchos años se pensó que la trucha nativa de América del Norte (*Salmo gairdneri*) no estaba emparentada con la trucha nativa de Kamchatka (*Salmo mykiss*), aunque actualmente pertenecen a la misma especie (McPhail y Lindsey, 1970). En 1989, las truchas arcoíris fueron reclasificadas como *Oncorhynchus mykiss*, más emparentadas al salmón del Pacífico que a otras especies de truchas (Smith y Stearley, 1989).

### 2.2.3. Rasgos físicos

Cuerpo alargado en forma de torpedo, con longitud promedio entre 30 a 60 cm. Presenta dos aletas en el dorso, una en la mitad del cuerpo (aleta dorsal) y la otra cercana al pedúnculo y de borde oscuro denominada aleta adiposa. La aleta caudal tiene bordes romos y se bifurca ligeramente, además posee una aleta anal, dos ventrales y dos pectorales. Al llegar a la etapa reproductiva los machos desarrollan una prolongación de la mandíbula en forma de gancho, mientras que la hembra tiene un cuerpo alargado, cabeza corta y boca pequeña (FAO, 2005-2018).

*Oncorhynchus mykiss* presenta en el dorso una coloración verde olivo con flancos con tonalidad más claras, en estos se observa la característica franja iridiscente rojo violácea, parecido a

un arcoíris debido a la reflexión de la luz tal como se observa en la figura 6, con una coloración plateada por debajo de la línea lateral. Ostenta manchas negras en casi todo el cuerpo excepto en la cabeza y la horquilla. Es importante acotar que estas características de coloración pueden variar según el hábitat, la edad, el tamaño y la etapa reproductiva de los especímenes (Blanco, 1994).



**Figura 6.** Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

#### **2.2.4. Parámetros físico-químicos óptimos del agua**

**a. Temperatura:** La trucha arcoíris tiene predilección por ríos y lagos de aguas frías considerándose óptimo entre los 10 a 17°C, con aguas de corrientes moderadas, limpias y cristalinas. La tolerancia térmica máxima se ubica entre los 25°C y temperaturas cercanas a la congelación (INCAGRO, 2008). Los mejores resultados productivos se dan entre 15 a 16°C, temperaturas menores a esta suelen ralentizar el crecimiento mientras que temperaturas mayores pueden incrementar la aparición y diseminación de cuadros patológicos (FONDEPES, 2014).

**b. Oxígeno disuelto:** La sobrevivencia y desarrollo óptimo de las truchas en un sistema de cultivo depende de exigentes niveles de oxígeno disueltos en el agua, esta concentración frecuentemente oscila entre 4,5 a 5,9 mg/L. No obstante, la Norma Técnica Peruana 320.004 del año 2014 recomienda la utilización de concentraciones mayores a 5,5 mg/L además niveles inferiores de oxígeno son el principal factor estresante que ralentiza el crecimiento de las truchas. Si el oxígeno disuelto es menor a 3,0 mg/L se producirá mortalidad masiva en el cultivo de truchas (FONDEPES, 2014; NTP 320.004, 2014).

**c. Potencial de hidrógeno (pH):** El rango óptimo de pH en ambientes acuáticos destinados a la crianza de trucha arcoíris oscila entre 6,5 hasta un máximo de 8,5; valores con excesiva alcalinidad

o acidez son perjudiciales para las truchas generando cuadros asociados a toxicidad, incremento del estrés y lesiones branquiales que desencadenan eventos de elevada mortalidad o crecimiento deficiente. Es necesario supervisar los valores de pH diariamente, el desarrollo excesivo de algas o la abundancia de nutrientes nitrogenados o fosforados que varían los rangos óptimos de pH. (Iregui, 2007; Salie *et al.*, 2008).

**d. Compuestos nitrogenados:** Los compuestos nitrogenados que pueden ser potencialmente tóxicos en la truchicultura son el amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$  es la forma más tóxica en concentraciones pequeñas), nitritos y nitratos. Los valores aconsejables para amonio deben ser menores a 0,02 mg/L, los nitritos menores a 0,02 mg/L y los nitratos valores menores a 100 mg/L. Estos compuestos son incorporados al agua por el metabolismo de peces y bacterias que excretan o utilizan sustratos nitrogenados. (Mantilla, 2004; Iregui, 2007).

**e. Dureza Total, Alcalinidad y Dióxido de carbono:** La dureza es principalmente determinada por la concentración de iones como el calcio (Ca) y magnesio (Mg) en el agua, los valores recomendados en la crianza de truchas se encuentran entre 60 a 300 ppm. La alcalinidad del agua es otorgada por los carbonatos y bicarbonatos que ayudan a mantener un pH equilibrado siendo el rango adecuado 20 a 180 ppm. El dióxido de carbono no debe sobrepasar los 5 ppm ya que afecta la estabilidad del pH y dificulta la captación de oxígeno disuelto en el agua. Estos valores y otros se resumen en el cuadro 3 (RAGASH, 2009; Woynarovich, 2011; FONDEPES, 2014).

**Cuadro 3.** Rangos óptimos del ambiente acuático a tomarse en cuenta en el cultivo de la trucha  
(Cuadro modificado de RAGASH, 2009).

| Parámetro                           | Rango óptimo | Parámetro                  | Rango óptimo |
|-------------------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )  | 10 – 17      | Nitratos (mg/l)            | < 100        |
| Oxígeno disuelto (mg/l)             | 4,5 - 5,9    | Nitritos (mg/l)            | < 0,02       |
| pH                                  | 6,5 - 8,5    | Nitrógeno amoniacal (mg/l) | < 0,012      |
| $\text{CO}_2$ (ppm)                 | < 5          | Fosfatos (mg/l)            | > 500        |
| Alcalinidad (mg/l $\text{CaCO}_3$ ) | 20 – 180     | Sulfatos (mg/l)            | > 45         |
| Dureza (mg/l $\text{CaCO}_3$ )      | 60 – 300     | Fierro (mg/l)              | < 0,1        |
| $\text{NH}_3$                       | < 0,02       | Cobre (mg/l)               | < 0,05       |
| $\text{H}_2\text{S}$ (mg/l)         | $\leq 0,002$ | Plomo, Mercurio (mg/l)     | 0,03 - 0,05  |

### 2.3. Aeromoniasis

La aeromoniasis es causada por bacterias del género *Aeromonas* (“unidades productoras de gas”), denominada así por Stainer en 1943 según el Comité Internacional de Sistemática de Bacteriología. En las primeras descripciones de Sanarelli en 1891 se le llamó *Bacillus hydrophillus*, siendo aislado de focos septicémicos de ganglios de anfibios (Farmer *et al.*, 2006), la identificación en esas épocas no permitía una adecuada caracterización incluso entre especies iguales de *Aeromonas* (Cipriano y Bullock, 2001). Son microorganismos ubicuos en ambientes acuáticos, aislados en especies poiquilothermas como peces sanos y enfermos (Lázara, 2007).

En la actualidad se conoce que las bacterias del género *Aeromonas* pueden ser halladas en variadas fuentes de agua y son importantes patógenos que afectan no solo a animales poiquilothermos, como peces dulceacuícolas, sino también originan cuadros de enfermedad e infecciones en humanos inmunocomprometidos y están presentes en alimentos de consumo humano. Dentro de las especies patógenas más estudiadas se encuentra *Aeromonas salmonicida* bacteria causante de mortalidad y pérdidas económicas en truchas y otras especies cultivadas en acuicultura (Austin y Austin, 1993; Janda y Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2012).

A mediados de 1965 la Familia Vibrionaceae incluía al género *Aeromonas*. Para 1970, las *Aeromonas* fueron agrupadas en cepas mesófilas y psicrófilas en base a la temperatura de crecimiento. Sin embargo, Colwell *et al.* (1986), en investigaciones de reasociación utilizando secuencias genéticas del ARNr 5S y 16S, justificaron la creación de la familia Aeromonadaceae desvinculándola de la Familia Vibrionaceae. En la actualidad se conocen cerca de 30 especies del género *Aeromonas*, este proceso contempló varias reclasificaciones originando subespecies para *A. salmonicida* y *A. hydrophila* (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Latif-Eugenín, 2016).

#### 2.3.1. *Aeromonas*: Características y taxonomía

Estructuralmente las bacterias del género *Aeromonas* se presentan en forma de bacilos, aunque es posible hallar cepas cocobacilares o cocoides, tienen un tamaño de 1,3 - 2,0 x 0,8 - 1,3  $\mu\text{m}$ , además no forman espora, presentan flagelos para su locomoción (excepto *A. salmonicida*). Fisiológicamente son anaerobios facultativos, se desarrollan en temperaturas entre 22 a 37°C, crecen en medios nutritivos con 0 a 5% de NaCl. Bioquímicamente son considerados Gram negativos, evidencian una reacción positiva en la prueba de citocromo oxidasa, oxidan y fermentan la glucosa, reducen los nitratos a nitritos y presenta diversos factores de virulencia (Hiney y Oliver, 1999; Abbott *et al.*, 2003; Martín–Carnahan y Joseph, 2005).

La clasificación taxonómica para el género *Aeromonas* en concordancia con las versiones más actualizadas del Manual de Bergey (Martín–Carnahan y Joseph, 2005) y del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) es la siguiente:

|                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| <b>Dominio</b>  | : Bacteria             |
| <b>Phylum</b>   | : Proteobacteria       |
| <b>Clase</b>    | : Gammaproteobacteria  |
| <b>Orden</b>    | : Aeromonadales        |
| <b>Familia</b>  | : Aeromonadaceae       |
| <b>Género</b>   | : <i>Aeromonas</i>     |
| <b>Especies</b> | : <i>Aeromonas</i> sp. |

El ICSP (*International Committee on Systematics of Prokaryotes*) aconseja definir los organismos procariotas mediante el estudio del fenotipo (como pruebas morfológicas y bioquímicas), del genotipo y la filogenia (como el estudio molecular y de secuencias genéticas de ARNr 16S) (Stackebrandt *et al.*, 2002; Figueras *et al.*, 2011). Según el Manual de Bergey, la Familia Aeromonadaceae, además del género *Aeromonas*, actualmente incluye a las *Tulomonas* y *Oceanimonas*. Asimismo, en la actualidad, se aceptan 5 subespecies para *Aeromonas salmonicida* (subsp. *salmonicida*, *masoucida*, *achromogenes*, *pectinolytica* y *smithia*) y 2 subespecies para *Aeromonas hydrophila* (subsp. *hydrophila* y *ranae*) (Lázara, 2007; Latif-Eugenín, 2016).

### 2.3.2. Factores de virulencia

Se conocen diversos factores de virulencia de *Aeromonas* relacionados a sus estructuras biológicas que la conforman y de las exotoxinas que elaboran y liberan en su proceso metabólico.

**Cápsula:** Es una estructura conformada por polisacáridos que permite la evasión de la fagocitosis, como principal mecanismo de virulencia, mediada por células del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, estas se pueden hallar en determinados serogrupos de *Aeromonas hydrophila* mesófilas como O:11 y O:34 (Martínez *et al.*, 1995; Rasmunssen-Ivery *et al.*, 2016).

**Capa S:** Estructura bacteriana conformada por proteínas que confiere virulencia mediante la resistencia a la acción bactericida del complemento y permitiendo la interacción y unión de *Aeromonas* con células y tejidos del hospedero. Es formado a partir del gen *ahsA* y se puede hallar

en serogrupos de *A. hydrophila* como el O:11, O:14 y O:81, además se emplea en estudios de virulencia de *A. salmonicida* (Castro–Escarpulli *et al.*, 2002; Menanteau-Ledouble *et al.*, 2016).

**Capa A:** Es una capa proteica adicional a la membrana celular denominada Envoltura Celular Adicional (ACE por sus siglas en inglés), es encontrada en cepas virulentas de *A. salmonicida* permitiéndoles adherirse y penetrar en componentes celulares del huésped así como la sobrevivencia a los mecanismos fagocitarios, razón por la cual es utilizado en el desarrollo de vacunas en peces de acuicultura como el bacalao atlántico (Lund *et al.*, 2003; Arnesen *et al.*, 2010).

**Lipopolisacáridos (LPS):** Este glicoconjugado es único de bacterias gramnegativas y su principal estructura es el antígeno O cuyo fundamental mecanismo de virulencia en *Aeromonas* es actuar como factor de colonización y evitar la opsonización por fagocitosis. Su presentación puede estar condicionada por la temperatura (como en *A. piscicola*), además son desarrolladas hasta por ocho diferentes cluster de genes (como en *A. hydrophila*) y están relacionados a los sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) presente en *Aeromonas* (Vilches, 2009; Sierra *et al.*, 2010; Hossai, 2012).

**Hemolisinas:** Dentro del género *Aeromonas* se le denomina comúnmente aerolisina, la cual origina una beta hemolisis. Forma poros en las membranas celulares que conlleva al ingreso de agua y ulterior citólisis, presenta también actividad citotóxica y enterotóxica como es observada en *A. hydrophila*. Se asemeja a la toxina alfa de *Staphylococcus aureus* y a la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Castro–Escarpulli *et al.*, 2002; Yu *et al.* 2007; Tomás, 2012).

**Proteasas:** Las proteasas de *Aeromonas* son responsables de ocasionar la degradación de estructuras como fibrina, elastina o albúmina. En estudios realizados en *A. hydrophila* se pudieron constatar la presencia de metaloproteasas y serin-proteasas relacionadas a lesiones epiteliales en peces. Adicionalmente, *A. piscicola* desarrolla acción colagenasa y citotóxica en truchas enfermas. La producción está regulada por *quorum sensing* y la secreción extracelular, mediada por sistemas de secreción, especialmente T2SS (Rasch *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2015).

**Lipasas:** Presentan diversas funciones, pero su acción primordial es actuar como enzimas o toxinas extracelulares realizando la hidrólisis de lípidos de membranas de células eucariotas. Las principales lipasas que afectan diversas funciones inmunes son glicerofosfolípidos colesterol aciltransferasa (GCAT) y fosfolipasa C (Plc) halladas en *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y fosfolipasa A1 (pla) en *A. piscicola*, además en *A. dhakensis* se pueden hallar variantes de lipasas lábiles a altas temperaturas (Alt) o estables (Ast) (Li *et al.*, 2011; Rasmunssen-Ivery *et al.*, 2016).

**Sideróforos:** Son estructuras bacterianas con gran capacidad secuestrante de hierro cuya síntesis es regulada por condiciones estresantes, principalmente, la disminución o limitada concentración de hierro en el medio interno del huésped. Estos son denominados siderobactinas en *A. hydrophila* y *A. caviae*. En la regulación de la captación del hierro en *A. salmonicida* se conocen cepas típicas (dependiente de sideróforos) y cepas atípicas que no presentan sideróforos ya que usan la acción proteolítica de metaloproteasas para separar el hierro de la transferrina o la hemoglobina (Fernández *et al.*, 1998; Castro–Escarpulli *et al.*, 2002; Tomás, 2012).

### **2.3.3. *Aeromonas* patógenas en salmónidos**

#### **2.3.3.1. *Aeromonas salmonicida* y Forunculosis**

Pertenecientes a la familia *Aeromonadaceae*, básicamente son bacilos no móviles, Gramnegativos y anaerobios facultativos. Enmarcados dentro de las especies psicrófilas que es conformada por cinco subespecies (*salmonicida*, *masoucida*, *achromogenes*, *pectinolytica* y *smithia*). La bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* subespecie (subsp.) *salmonicida* se describe, por lo general, a manera de la “cepa típica” asociada a diversos cuadros patológicos en peces de la familia *Salmonidae*, como la trucha arcoíris (Boone *et al.* 2001; Burr y Frey, 2007).

Las restantes subespecies (subsp.) además de otras cepas aún no clasificadas en algunas de las, ya mencionadas, subespecies son consideradas a modo de “cepas no típicas o aislados atípicos” de *A. salmonicida*. Estas cepas son fundamentalmente psicrófilas, aunque también mesófilas, y son usualmente no móviles. Estas bacterias “no típicas” se asocian frecuentemente a infecciones tanto ulcerativas como sistémicas que afectan a salmónidos y a otros peces (Reith *et al.* 2008).

Las bacterias del género *Aeromonas* siguen siendo constantemente clasificadas, sobre todo, filogenéticamente, motivo por el cual, en la actualidad, a veces es difícil entender y manejar los sistemas de clasificación porque hay nuevas especies siendo incluidas y otras siendo renombradas. Así, aún hay opiniones divergentes acerca de la clasificación en cepas típicas o atípicas, situación que mejorará mientras mejore la información genómica disponible (Aravena-Roman *et al.*, 2013).

El crecimiento adecuado de *Aeromonas salmonicida* se observa entre 18 a 25 °C, ya que una temperatura aún mayor pueden perder o tener inactivados algunos genes de virulencia. Tras la incubación a 18 °C por 18 a 24 horas las colonias miden 0,5 a 1 mm y tras 3 días se aprecian colonias circulares, convexas y friables de 1 a 2 mm de diámetro. Una peculiaridad de esta bacteria (subsp. *salmonicida*) es la producción de un halo café hidrosoluble, desarrollado básicamente en



agares que presentan triptona, tirosina o fenilalanina, sin embargo no todas las cepas lo producen en diferentes condiciones (Boone *et al.*, 2001, Brenner *et al.*, 2005; Daher *et al.*, 2011).

- **Forunculosis:**

La bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* es el patógeno que ocasiona la forunculosis, una enfermedad que afecta a peces salmónidos como los salmones y las truchas que es caracterizada por mortalidad y alta morbilidad. Es una patología compleja que adopta diferentes formas dependiendo de la salud, edad y especie de salmónido así como también de las condiciones medioambientales, especialmente la temperatura. Esta afección es denominada así por los forúnculos que se generan sobre el tejido epitelial y muscular de los peces afectados por el curso subagudo a crónico de la infección. (Janda y Abbott, 2010; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

La forma subaguda a crónica usualmente se presenta en peces adultos o viejos y es caracterizado por oscurecimiento de la piel, melanosis, pérdida de apetito, letargia, y hemorragias en la base de las aletas. Otra característica de la forma subaguda y crónica de la enfermedad es que tiene una lenta presentación de síntomas y presenta una mortalidad no tan alta o, incluso, baja (Boyd *et al.*, 2003; Austin y Austin, 2007).

La forma aguda, sin embargo, es mayormente observado en salmónidos juveniles, donde la enfermedad rápidamente se encamina a un cuadro septicémico que es el resultado de la formación de lesiones necróticas en la piel y hemorragias localizadas en diversos órganos. Esta forma causa mortalidad masiva de peces de forma abrupta, sin una evidencia clínica excepto por el oscurecimiento en la pigmentación de la piel, letargia y pérdida de apetito. Se ha reportado también, una variante latente de la infección en la cual las truchas son portadoras sub-clínicas de los agentes patógenos (Burr *et al.*, 2005; Plumb y Hanson, 2011).

La enfermedad progresa en salmónidos de vida silvestre como en peces cultivados en acuicultura como es el caso del salmón del Atlántico, la trucha arcoíris y otros salmónidos. La infección tiene un impacto significativo cuando afecta a peces de vida libre sin embargo, las consecuencias son más severas especialmente en salmónidos susceptibles criados por acuicultura que no han sido protegidos mediante vacunación (Bergh, 2008).

No obstante, la aplicación de vacunas eficientes contra forunculosis pueden ser muy caras para algunos acuicultores e incluso se pueden desarrollar algunos efectos colaterales. Además, pese a la constante mejora de las vacunas aun presentan ciertas limitaciones que dependen del tipo de

vacuna, del nivel de inmunoprotección que puede disminuir a bajas temperaturas o por el tiempo e incluso una mala administración puede causar problemas de salud, baja producción y no aseguraría la no transmisión post tratamiento (Cipriano y Austin, 2011).

El pez de acuicultura está sujeto a factores estresantes como el alto nivel de materia orgánica ambiental, los variables niveles de oxígeno disponible o el cultivo en altas densidades que incrementan su susceptibilidad a infecciones como la forunculosis. Esta se disemina a través del contacto con peces infectados o simplemente por la exposición a aguas contaminadas con *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Ergo, se debe vigilar el ingreso de peces o materiales a las instalaciones acuícolas para evitar infectar peces sanos (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

### **2.3.3.2. *Aeromonas hydrophila* y MAS**

Esta bacteria del género *Aeromonas* comparte algunas características con *A. salmonicida* como tener forma bacilar o cocobacilar, ser Gram-negativo y anaerobio facultativo. Sin embargo, mientras *A. salmonicida* es el agente causal de la forunculosis, la literatura describe a *Aeromonas hydrophila* como una especie que origina cuadros septicémico - hemorrágicos, no forman esporas, presentan flagelo polar único por lo que son considerados bacterias patógenas móviles, así como resistencia al factor vibrostático O/129 (Hatha *et al.*, 2005; Plumb y Hanson, 2011).

Es posible aislar *A. hydrophila* a partir de muestras de peces dulceacuícolas cultivados en piscigranjas como ciprínidos y salmónidos. Estas bacterias presentan buena halotolerancia y una marcada actividad hemolítica que se vincula a la presencia de factores de virulencia con capacidad enzimática. *A. hydrophila* puede comportarse como un patógeno primario, donde inicia una enfermedad por sí mismo; sin embargo, es más reconocido como un patógeno secundario, asociándose a lesiones ulcerativas en la superficie corporal de peces, e incluso humanos, estresados o infectados previamente (Harikrishnan y Balasundaram, 2005; Janda y Abbott, 2010).

#### **▪ Septicemia por *Aeromonas* Móviles (MAS)**

*Aeromonas hydrophila* es el principal microorganismo involucrado en este cuadro septicémico y hemorrágico, pero también puede estar asociado a otras *Aeromonas*, como *Aeromonas bestiarum* o *A. veronii*, y a condiciones estresantes. Estas bacterias presentan flagelos y son los factores etiológicos de la Septicemia por *Aeromonas* Móviles (MAS por sus siglas en inglés) que causa una enfermedad bacteriana especialmente peligrosa para peces marinos,

dulceacuícolas e incluso peces ornamentales. Esta patología se presenta de forma aguda, crónica o como infección latente (Harikrishnan y Balasundaram, 2005; Noga, 2010).

Los síntomas más prominentes de la forma crónica de MAS (Motile *Aeromonas* Septicemia) son la ulceración dermal y la necrosis muscular. Además, la respuesta inmune se suprime ante la incidencia de una enfermedad y en este periodo la susceptibilidad a MAS se incrementa de forma alarmante. Otros factores ambientales estresantes son el hacinamiento, cantidad de oxígeno disuelto, cantidad de materia orgánica, contaminación del agua, temperaturas fluctuantes, lesiones físicas y condiciones fisiológicas como el desove (Austin y Austin, 2007; Kozińska, 2007).

#### **2.3.3.3. Otras *Aeromonas* de importancia**

El género *Aeromonas* incluye patógenas de peces y otros animales. En la actualidad alrededor de 30 especies han sido identificadas y reconocidas genéticamente dentro de este género, y un número importante de estas fueron aisladas de ambientes acuáticos donde son patógenos oportunistas y causan brotes severos. Sin considerar a *Aeromonas salmonicida* y *A. hydrophila*, otras especies que desarrollan cuadros patológicos importantes en salmónidos son: *Aeromonas bestiarum*, *A. caviae*, *A. piscícola* y *A. veronii*, todas ellas asociados a la septicemia por *Aeromonas* móviles (Janda y Abbott, 2010; Aravena-Román, 2013; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

Zepeda-Velázquez *et al.* (2017) realizaron estudios experimentales de patogenicidad en alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) usando *Aeromonas* sp. en inmersión. Se evidenció la mortalidad causada por *Aeromonas sobria* (1,1%), *A. caviae* (3,3%), *A. veronii* (8,8%), *A. bestiarum* (8,8%), *A. hydrophila* (12,2%) y *A. salmonicida* (18,8%) Sin embargo no se reportó mortalidad tras la infección con *Aeromonas popoffii*, *A. media*, *A. lusitana* y *A. allosaccharophila*. La identificación bioquímica de estas especies es posible pero se recomienda realizar estudios moleculares o filogenéticos confirmatorios (Noga, 2010, Navarro y Martínez-Murcia, 2018).

#### **2.3.4. Aeromoniasis: signología y patogenia**

##### **2.3.4.1. Forunculosis**

*Aeromonas salmonicida* es un agente patógeno primario que afecta a salmónidos introduciéndose a las piscigranjas a través de peces portadores asintomáticos tomados como “sanos” y por peces recuperados de la patología, generándose una liberación constante de patógenos al agua lo que predispone a la aparición de brotes ya que todas las etapas productivas son susceptibles.

Además *A. salmonicida* puede sobrevivir en cuerpos de agua, a expensas de los peces, cuando las condiciones le son favorables (Hiney *et al.*, 1997; Jonh *et al.*, 2011; Zepeda-Velásquez, 2015b).

Austin y Austin (2007) mencionan que la piel de los peces enfermos se oscurece de forma anormal, lo que es denominado melanosis, y que los animales infectados pueden morir o sobrevivir aun si las lesiones afectan la musculatura esquelética. La signología de la forunculosis se relaciona con el curso de la enfermedad, así una infección hiperaguda desarrollará muerte súbita y masiva, sobre todo en alevines de salmónidos (Kozínska, 2007). Así, la morbilidad en peces susceptibles que viven en condiciones estresantes es del 90%, mientras que el desenlace de la enfermedad en peces infectados genera una mortalidad muy variable de entre 0 a 100% (Jonh *et al.*, 2011).

En los peces adultos se presenta un proceso clínico agudo que generalmente desarrolla una septicemia hemorrágica que no necesariamente evidencian forúnculos en el tejido epitelial. No obstante, cuando se forman las lesiones forunculosas se incrementa la diseminación de la bacteria en el medio acuático gracias a la erosión, ulceración y posterior secreción de fluido y tejido necrohemorrágico (Inglis *et al.*, 1993; Noga, 2010).

En la infección crónica, el desarrollo de la enfermedad es retardado y progresivo lo que promueve una diseminación de la bacteria a diversos órganos de los salmónidos, afectando frecuentemente riñón, bazo, hígado, tracto intestinal y branquias, además puede lesionar incluso las células epiteliales de los vasos sanguíneos. En este tipo de infección se observa peces aletargados, reducción notable en el consumo, exoftalmia, hemorragias petequiales en la base de las aletas, pequeñas a severas lesiones ulcerativas multifocales en la piel (Austin y Austin, 2007; Noga, 2010).

#### **2.3.4.2. Septicemia por *Aeromonas* Móviles (MAS)**

Para describir los signos clínicos del Septicemia ocasionado por *Aeromonas* móviles se tomará como modelo a *Aeromonas hydrophila*, ya que las demás especies móviles se presentan de forma similar. Los peces infectados por *A. hydrophila* suelen tener diferentes síntomas como muerte repentina de peces aparentemente sanos, falta de apetito, branquias pálidas, nado anormal, apariencia hinchada y ulceraciones epiteliales. A la inspección se evidencia también exoftalmia, melanosis y abdomen abultado (Cipriano, 2001; Zepeda-Velásquez, 2015b).

Las úlceras se presentan de diferente profundidad (afectando dermis, musculatura o cavidad abdominal) y extensión. Las ulceraciones son focales o multifocales, situadas en casi todo el cuerpo además frecuentemente rodeado de un contorno brillante de tejido dérmico rojizo. Otros órganos

comúnmente afectados por el desarrollo de la enfermedad incluyen las branquias, el riñón, hígado, bazo, páncreas y músculo esquelético. Las hemorragias petequiales y la necrosis afectan también la base de las aletas dorsales y ventrales (Austin y Austin, 2007; Noga, 2010).

Los síntomas varían ya que están sujetos a numerosos factores, incluyendo la virulencia del microorganismo, la resistencia del pez a la infección, la presencia o ausencia de bacteriemia o septicemia y los factores estresantes asociados con el pez. La morbilidad ronda el 80% y la mortalidad acumulada puede llegar al 50% en una población de peces. Debido a la variabilidad de estos síntomas, el diagnóstico de la enfermedad basado solo en los síntomas es poco fiable prefiriéndose así las pruebas de laboratorio (Saavedra *et al.*, 2004; Nam y Joh, 2007).

### **2.3.5. Susceptibilidad y rango de hospederos**

La apreciación de los diferentes signos clínicos asociados tanto a forunculosis como a la Septicemia por *Aeromonas* móviles (MAS) varían de acuerdo al curso de la infección, el grupo etario, la especie de salmónido, la patogenicidad bacteriana, los estresores y las condiciones ambientales. Así, la principal característica de MAS es presentar cuadros clínicos a subclínicos, mientras que forunculosis presenta curso subagudo a crónico, con ulceraciones hasta forúnculos que involucran tejido epitelial y muscular (Brown, 2000; Austin y Austin, 2007).

En piscigranjas la principal vía de infección es transmisión horizontal debido a la cohabitación de peces enfermos o portadores con peces susceptibles en un ambiente estresante. La diseminación de bacterias mediante lesiones forunculosis, necróticas-hemorragicas y productos de excreción en el agua conlleva a una exposición constante, generando que el agua se transforme en un foco infectivo crucial en la aparición de brotes. Sin embargo, las *Aeromonas* sobreviven en el agua, fueron detectados en tejidos de peces sin signos clínicos, además la vegetación y las biopelículas son reservorios adicionales (Rahman *et al.*, 2007; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

Las *Aeromonas* tienen una amplia distribución en diversos cuerpos de agua, prosperando en ambientes dulceacuícolas y ambientes marinos poco salinos, incluso hallándose en la microbiota intestinal normal de peces. Entre sus diversos hospederos destacan peces (tilapias, carpas, anguilas, salmones, truchas), reptiles (cocodrilos, ranas), mamíferos (lobos marinos, animales domésticos, humanos) (Austin y Austin, 2007; Zepeda-Velásquez, 2015b). En la industria alimentaria es aislado de pescado, carnes, embutidos y lácteos; además de ser una bacteria importante en salud pública por vincularse a cuadros patológicos gastrointestinales, epiteliales y ocasionar infecciones a pacientes inmunocomprometidos (Yang *et al.*, 2008; Janda y Abbott, 2010; Meik *et al.*, 2011).

### 2.3.6. Identificación

#### 2.3.6.1. Caracterización fenotípica

Las características fenotípicas clásicas y comunes entre las bacterias del género *Aeromonas* son: morfología bacilar o cocobacilar, tinción de Gram negativa, fisiológicamente son anaerobias facultativas, toleran de 5 a 10% de NaCl en medio nutritivo y se desarrollan en un amplio rango de temperaturas (0 a 45°C). Crecen en medios de cultivo como el TSA (Agar de soja triptica), generan hemólisis en el agar sangre además oxidan-fermentan la glucosa, presentan la enzima citocromo oxidasa y no producen ácido de inositol (Martín-Carnahan y Joseph, 2005; Janda y Abbott, 2010).

El aislamiento de especies de *Aeromonas* es facilitado por medios selectivos como el GSP (Glutamate Starch Phenol Agar) o agar selectivo *Aeromonas-Pseudomonas* (Kielwein) donde las *Aeromonas* consumen el sustrato a base de almidón acidificando el medio y tornándolo amarillo. Los sistemas no automatizados han logrado una aceptable identificación bioquímica solo de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*; mientras que los sistemas automatizados no diferencian las especies de *Aeromonas* con las de *Vibrio*. En ambos casos es necesaria una ulterior confirmación molecular (Havelaar *et al.* 1987; Janda y Abbott, 2010; Latif-Eugenín, 2016).

La existencia de *Aeromonas salmonicida* atípicas con presentación variable del pigmento café, catalasa negativas y un crecimiento mayor a 5 días, refuerza la idea que resulta bastante peliagudo identificar o diferenciar especies de *Aeromonas* usando solo pruebas bioquímicas, así Castro-Escarpulli *et al.* (2003) consideran un mínimo de 19 pruebas bioquímicas mientras que Abbott *et al.* (2003) mencionan que solo 9 pruebas bioquímicas generan resultados comunes fiables, entre ellas la reacción de la enzima citocromo-oxidasa, la reducción de nitratos, además de la capacidad de fermentar o no fermentar determinados carbohidratos (Buller, 2014).

#### 2.3.6.2. Identificación molecular y filogenética

La identificación bioquímica puede ayudar a identificar bacterias del género *Aeromonas* pero la identificación fiable de especies de *Aeromonas* recae en la utilización de marcadores moleculares que posibilite una detección de determinados genes como el gen ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) cuya secuencia puede ayudar a diseñar cebadores o “*primers*” universales y diferenciar o comparar especies poco o estrechamente relacionadas. Entre otros marcadores moleculares tenemos: *gyrB* (ADN girasa, subunidad beta), *rpoD* y *rpoB* (ARN polimerasa, subunidades delta y beta) (Chakravorty *et al.*, 2007; Janda y Abbott, 2010).

Otras técnicas moleculares que usan al gen ANRr 16S son: RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) y MALDI-TOF (Desorción-Ionización con Láser Asistido por Matriz). Los métodos de identificación más comunes emplean variantes de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), el tipado molecular (como ERIC-PCR), la secuenciación y, actualmente, el Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA) con el estudio filogenético de los genes *housekeeping*, técnica más sencilla y más rápida de ejecutar que el método *gold standard*, la hibridación ADN-ADN (DDH) (Zepeda-Velásquez, 2015b; Latif-Eugenín, 2016).

### **2.3.7. Control y prevención**

El control de la aeromoniasis incluye la separación de peces con signología similar a aeromoniasis como ulceraciones, melanosis y comportamiento anómalo, y la correcta eliminación de peces moribundos o muertos. Es necesario corregir los parámetros fisicoquímicos del agua tales como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, compuestos nitrogenados y reducir o eliminar los desechos orgánicos. En los cuadros crónicos de la Septicemia por *Aeromonas* móviles la antibioticoterapia no es recomendada ya que la infección tiende a ser autolimitante, sin embargo frente a los cuadros agudos o severos de forunculosis con una incrementada mortalidad se puede emplear fármacos como la oxitetraciclina o florfenicol, haciendo un uso racional de estos para evitar la resistencia a los antimicrobianos (Ortega *et al.*, 2002; Noga, 2010).

Dentro de las medidas preventivas es primordial la correcta desinfección y sanitización de los centros de crianza de alevines y la piscigranja para evitar infecciones y subsecuentes brotes. Si la piscigranja reutiliza el agua se aconseja utilizar un filtro con irradiación ultravioleta o el uso de ozono. Regular y monitorear constantemente los posibles factores estresantes en el ambiente acuático (p.e.: temperatura, concentración de oxígeno disuelto, de amonio y dióxido de carbono) para eliminar estresores y evitar que los problemas se agraven. Es importante la vacunación con cepas de *Aeromonas* aisladas de zonas endémicas (Cipriano, 2001; LaPatra *et al.*, 2010).

La superficie de las cajas donde llegan las nuevas ovas debe ser desinfectada para prevenir la contaminación de instrumentos e instalaciones de los peces. Estas ovas deben ser debidamente desinfectadas con yodo tamponado al 100 ppm (partes por millón). Es prudente que los acuicultores eviten la introducción de peces en los centros de crianza de alevines, pozas o jaulas si han presentado una infección recientemente. En el 2016, Sanipes (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera) incorporó a la Aeromoniasis en el marco de su programa para el control de las enfermedades que afectan a los animales acuáticos (Kirkán *et al.*, 2003; SANIPES, 2016).

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Lugar de Estudio**

El estudio incluyó seis (6) piscigranjas de truchas arcoíris ubicadas en las regiones de Junín (2), Pasco (2), Cajamarca (1) y Ancash (1) durante los años 2017 – 2018. El procesamiento de las muestras y la realización de las pruebas bioquímicas y moleculares se realizó en la Sección Ictiopatología del Laboratorio de Histología Embriología y Patología Veterinaria, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV- UNMSM).

#### **3.2. Material biológico**

El estudio utilizó sesenta (60) especímenes de trucha arcoíris juveniles (*Oncorhynchus mykiss*) de 4 a 5 meses provenientes de Junín (20), Pasco (20), Cajamarca (12) y Ancash (8), con signos clínicos sugerentes de aeromoniasis. Se usó asas para siembra bacteriológica estéril circular para sembrar muestras de bazo y riñón anterior en placas Petri con agar TSA (Agar de Soja Trípica) y GSP (Glutamate Starch Phenol Agar) (Anexo 2). Se acondicionó salas para efectuar la necropsia y siembra bacteriológica, después de esto se transportó al laboratorio en Lima.

#### **3.3. Tamaño de muestra**

Se seleccionaron 60 peces de cultivo mediante muestreo de tipo no probabilístico (De Blas, 2008), se tomó como criterios de inclusión: truchas juveniles de 4 a 5 meses, con signología sugerente de brotes de aeromoniasis (lesiones ulcerosas en la piel, melanosis, necrosis y hemorragias en aletas, distensión abdominal y comportamiento anómalo). En este caso, un muestreo intencionado es adecuado en el diagnóstico de enfermedades en poblaciones de peces que han presentado brotes de enfermedad o mortalidad reciente (Padrós y Zarza, 2005; Noga, 2010).



### **3.4. Metodología**

#### **3.4.1. Toma de muestras biológicas**

**Estudio clínico:** Las truchas juveniles de 4 a 5 meses, se seleccionaron de pozas y jaulas de piscigranjas de Junín, Pasco, Cajamarca y Ancash. Estos peces presentaron lesiones y signos clínicos compatibles a aeromoniasis como factor de inclusión del muestreo (comportamiento anómalo, melanosis, úlceras epiteliales, necrosis y hemorragias en aletas, distensión abdominal). Fueron transportadas en baldes con agua de la misma poza hasta el ambiente designado para realizar la necropsia. Se identificó cada espécimen y se inspeccionó la superficie corporal anotándose la presencia de anormalidades macroscópicas visibles.

**Estudios anatomopatológicos:** La anestesia se realizó mediante las recomendaciones de CCAC (2010) para la cual se realizó baños de inmersión en Eugenol por 3-5 minutos, con dosis de 60 mg disuelto en un (1) litro de agua, el estado de anestesia se confirmó mediante la descoordinación en el nado y reducción de la ventilación (opercular). Para el sacrificio de los peces se realizó el corte medular entre el cráneo y la médula espinal, posteriormente, el desangrado. Antes de la necropsia se desinfectó la superficie del pez con torundas y alcohol al 70%.

Al inicio de la necropsia se observan las vísceras *in situ*. Posteriormente se exponen las branquias y la cavidad celómica, para luego efectuar un examen macroscópico enfocado en órganos internos como intestinos, ciegos pilóricos, estómago, hígado, vesícula biliar, vejiga natatoria y riñón para así identificar, describir y registrar anormalidades o lesiones presentadas. Para la metodología de la necropsia se tuvo en cuenta los estudios de Ostrande (2000).

#### **3.4.2. Siembra y cultivo bacteriano**

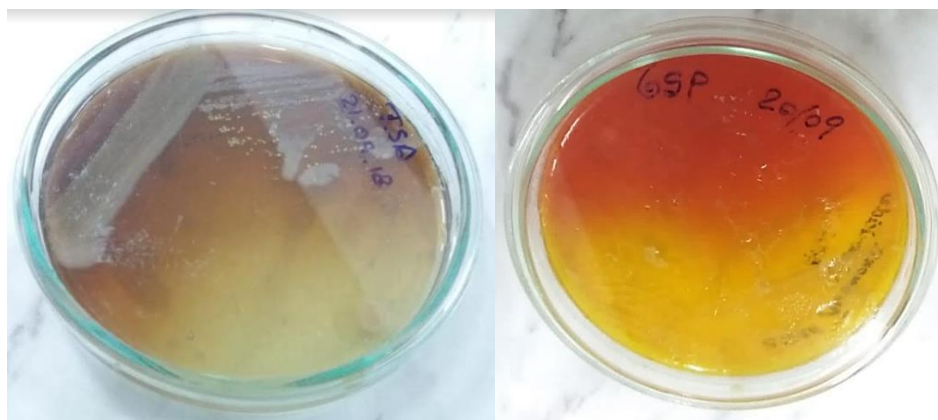
Tras exponer el bazo y el riñón anterior, se realiza una incisión estéril en la superficie de estos órganos, tras esto se efectuaron piquetes con asa de siembra bacteriológica estéril para luego sembrar por agotamiento en placas con agar TSA y GSP. Para la identificación se usaron las siglas: T (trucha muestreada), B (muestra de bazo), R (muestras de riñón anterior), se enumeraron según el orden de necropsia de cada espécimen y rotulados con lugar y fecha.

Las placas se transportaron a una temperatura aproximada de entre 10 a 15°C dentro de un cooler con geles refrigerantes. Una vez en el laboratorio de la Sección de Ictiopatología (Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM) se desinfectaron la superficie de las placas y se almacenaron en la estufa a una temperatura de incubación de 25°C por 24 a 48 horas.

### 3.4.3. Caracterización de colonias

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la observación y selección de colonias con características similares a *Aeromonas* en los medios TSA y GSP previamente sembrados. Se deben observar las colonias blanquecinas y circulares de 2 a 3 mm, el viraje amarillo del agar selectivo GSP producido por bacterias del género *Aeromonas*, la presentación del pigmento marrón en el medio TSA típico de *A. salmonicida*, aunque no todas las cepas la generan.

Para asociar las colonias al género *Aeromonas* se utilizaron pruebas preliminares: la tinción Gram y las pruebas de oxidasa y catalasa. La tinción Gram evalúa la morfología bacteriana observada a través del microscopio óptico, además generalmente *Aeromonas* reacciona positivamente en las pruebas de oxidasa y catalasa (Buller, 2014). Las bacterias con características similares a *Aeromonas* deben pasar por pruebas bioquímicas posteriores.



**Figura 7.** Colonias de *Aeromonas salmonicida* en agar TSA exhibiendo pigmento marrón (izquierda). Colonias de *Aeromonas* sp. en agar GSP (derecha).

### 3.4.4. Caracterización bioquímica

Las *Aeromonas* fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas a través de un sistema no automatizado siguiendo las sugerencias de Buller (2014) como se consigna en el cuadro 4. La lectura de los resultados se realizó de 24 a 48 horas tras la siembra de las pruebas bioquímicas y la incubación en estufa (24 a 48 horas a 25°C). Para la elaboración, uso de reactivos e interpretación de las pruebas bioquímicas se empleó las descripciones de Brenner *et al.* (2005) y Buller (2014). Se priorizó la caracterización y diferenciación de cepas *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* de las *Aeromonas* móviles, principalmente *A. hydrophila*.

**Cuadro 4.** Pruebas bioquímicas realizadas para caracterizar las principales *Aeromonas* sp.

| Prueba bioquímica                                                                                                 | Sigla            | Reacción (Buller, 2014) |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------|----------------------|
|                                                                                                                   |                  | <i>A. salmonicida</i>   | <i>A. hydrophila</i> |
| Tinción Gram                                                                                                      | GM               | —                       | —                    |
| Oxidasa                                                                                                           | OX               | +                       | +                    |
| Catalasa                                                                                                          | CAT              | +                       | +                    |
| Hemólisis beta $\beta$                                                                                            | HE $\beta$       | +                       | +                    |
| Motilidad                                                                                                         | MOT              | —                       | +                    |
| Pigmento marrón                                                                                                   | PM               | v                       | -                    |
| Ornitina descarboxilasa                                                                                           | ODC              | —                       | —                    |
| Lisina descarboxilasa                                                                                             | LDC              | +*                      | +                    |
| Arginina deshidrogenasa                                                                                           | ADH              | +                       | +                    |
| Reducción de nitrato                                                                                              | NIT              | +                       | +                    |
| Indol                                                                                                             | IND              | —                       | +                    |
| Citrato                                                                                                           | CIT              | —                       | +*                   |
| Urea                                                                                                              | URE              | —                       | —                    |
| Degradación de Glucosa                                                                                            | GLU              | +                       | +                    |
| Degradación de Lactosa                                                                                            | LAC              | —                       | —                    |
| Degradación de Manitol                                                                                            | MAN              | +                       | +                    |
| Degradación de Gelatina                                                                                           | GEL              | +                       | +                    |
| Sulfuro de hidrógeno                                                                                              | H <sub>2</sub> S | —                       | —                    |
| (+) : reacción positiva; (—) : reacción negativa;<br>(+*) : positivo en 60% de las cepas; (v) : reacción variable |                  |                         |                      |

### 3.5. Identificación con técnicas moleculares

#### 3.5.1. Identificación por PCR

Se realizó PCR convencional para la confirmación de las cepas *Aeromonas* sp. previamente caracterizadas por pruebas bioquímicas. Se utilizaron *primers* específicos del gen ARNr 16S para identificar cepas *Aeromonas* sp. con un producto de 480 pb. Para *A. salmonicida* los *primers* *Fer3* (*Forward*) y *Fer4* (*Reverse*) amplificaron el gen *fstA* (gen del receptor sideróforo férrico) de 404 pares de base (pb), y para *A. hydrophila* se emplearon *primers* a partir del gen *gyrB* (subunidad B de la ADN girasa) con un amplicón de 144 pb como se detalla en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Detalles de los *primers* usados para la detección de *A. salmonicida* y *A. hydrophila*

| Especie de <i>Aeromonas</i>  | Gen que se busca amplificar                      | Primers o cebadores (5'- 3')                                             | Tamaño (pb) |
|------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Aeromonas</i> sp.         | ARNr 16S<br>(Persson <i>et al.</i> 2015)         | <i>Fw</i> : CGACGATCCCTAGCTGGTCT<br><i>Rv</i> : GCCTTCGCCACCGGTAT        | 480 pb      |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | <i>fstA</i><br>(Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> 2008) | <i>Fer3</i> : CGGTTTTGGCGCAGTGACG<br><i>Fer4</i> : AGGCGCTCGGTTTGGCTATCT | 404 pb      |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>  | <i>gyrB</i><br>(Persson <i>et al.</i> 2015)      | <i>Fw</i> : AGTCTGCCGCCAGTGGCGAC<br><i>Rv</i> : CGCCCATCGCCTGTTCGAC      | 144 pb      |

Con el objetivo de realizar la extracción de ADN bacteriano se empleó el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) y para la ejecución de la técnica de PCR se usó el kit comercial GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), para ambos kits se tomó en cuenta las recomendaciones del fabricante (Anexo 3).

Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis (90V durante 1 - 1,5 horas), para lo cual se empleó gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 1X, marcador de peso molecular o “*ladder*”, adicionalmente se incluyeron control positivo (cepas de *A. salmonicida* ATCC 33658 y de *A. hydrophila* ATCC 7966) y control negativo “NTC” (agua libre de nucleasas). Posteriormente se visualizó y comparó las bandas de ADN en transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, USA).

### 3.5.2. Secuenciación y BLAST

Se extrajeron y purificaron los productos obtenidos de la PCR de las cepas *A. salmonicida* y *A. hydrophila* con el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Luego se secuenciaron los productos empleando el servicio de Macrogen Inc. (Korea). Las secuencias obtenidas se alinearon y contrastaron con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) empleando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### 3.6. Preservación de las cepas

Para la criopreservación de cepas de *Aeromonas* sp., se trasladaron colonias con asa para siembra bacteriológica estéril desde las placas de agar hacia tubos crioviales de 2ml que contenían caldo tripticasa de soja (TSB) y Glicerol al 20%, los cuales fueron almacenados a -20°C hasta la realización de posteriores pruebas moleculares.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Presencia de signos clínicos y lesiones

Las truchas juveniles fueron seleccionadas, previo a la necropsia, por presentar signos clínicos y lesiones asociados a aeromoniasis, esta signología incluye comportamientos anómalos como nado errático o descoordinado, peces letárgicos e inapetentes, oscurecimiento de la piel o melanosis y la presencia de lesiones externas visibles como ulceraciones en la piel, zonas hemorrágicas, distensión del abdomen y necrosis de aletas, lo que también se corroboró al inicio del examen de necropsia (Figura 8).



**Figura 8.** Lesiones externas de truchas arcoíris: úlceras en la piel, lesiones necro-hemorrágicas y distensión abdominal.

Al momento de la necropsia se registró lesiones externas como melanosis (78,3%), necrosis de aletas (68,3%), ulceraciones epiteliales variadas (53,3%), hemorragia petequeial o equimótica en aletas (46,7%) y distensión del abdomen (28,3%). Luego se procedió a la apertura de los especímenes y se visualizaron las lesiones internas (Figura 9) como hepatomegalia (71,7%), esplenomegalia (63,3%), hemorragias petequiales en el hígado (43,3%) y hemorragias petequiales en ciegos pilóricos (16,7%) y grasa peritoneal (16,7%) (Cuadro 6).



**Figura 9.** Lesiones encontradas a la necropsia. Hepatomegalia, hemorragia petequeial en hígado, ciegos pilóricos y a nivel de grasa peritoneal.

**Cuadro 6.** Frecuencia de alteraciones patológicas macroscópicas observadas tras la necropsia de las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

| Alteraciones patológicas macroscópicas    | Frecuencia | %    |
|-------------------------------------------|------------|------|
| <b>Externas</b>                           |            |      |
| Melanosis de la piel                      | 47/60      | 78,3 |
| Necrosis de aletas                        | 41/60      | 68,3 |
| Ulceraciones epiteliales                  | 32/60      | 53,3 |
| Hemorragia en aletas                      | 28/60      | 46,7 |
| Distensión abdominal                      | 17/60      | 28,3 |
| <b>Internas</b>                           |            |      |
| Hepatomegalia                             | 43/60      | 71,7 |
| Esplenomegalia                            | 38/60      | 63,3 |
| Hemorragia petequeial en hígado           | 26/60      | 43,3 |
| Hemorragia petequeial en ciegos pilóricos | 10/60      | 16,7 |
| Hemorragia petequeial en grasa peritoneal | 10/60      | 16,7 |

## 4.2. Caracterización fenotípica

### 4.2.1. Caracterización preliminar

El cultivo y aislamiento bacteriano se efectuó en los medios TSA (Agar de Soja Tríplica) y GSP (Glutamate Starch Phenol Agar). En el medio TSA se logró obtener 60 cepas bacterianas, de las cuales solo una desarrolló un pigmento color café tenue, entre las 24 a 48 horas de incubación, tanto en los aislados de riñón anterior como en los de bazo. En el medio GSP, medio selectivo para *Aeromonas*, se pudo evidenciar el crecimiento de 12 aislados que viraron el medio rojo del agar a un color amarillo evidenciando la presencia de bacterias de este género (Cuadro 7).

En la caracterización fenotípica de aislados del género *Aeromonas* se apreció colonias que presentaban: desarrollo rápido (entre 24 a 48 horas), medidas de 2 a 3 mm de diámetro, formas circulares con bordes definidos y coloración blanquecina o cremosa. Posteriormente, la tinción Gram y la observación a través del microscopio óptico permitieron la visualización de la morfología bacteriana bacilar o cocobacilar y de la coloración acidófila o gramnegativa típicas.

Se realizaron las pruebas bioquímicas preliminares de oxidasa (reacción de la enzima citocromo oxidasa) y catalasa (reacción de la enzima catalasa). Ambas pruebas resultaron positivas para los 12 aislados de *Aeromonas* que, previamente, habían virado a amarillo el medio del agar GSP. Estas cepas del género *Aeromonas* provenían de Junín (7 aislados) y Cajamarca (5 aislados) habiéndose obtenido a partir de riñón anterior y bazo de las truchas arcoíris muestreadas.

**Cuadro 7.** Caracterización preliminar de los aislados presuntivos a *Aeromonas* sp. obtenidos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) enfermas de Junín y Cajamarca.

| Origen    | Especie               | Cepa | Desarrollo |          | Colonias                       | Gram | Morfología               | OX | CAT |
|-----------|-----------------------|------|------------|----------|--------------------------------|------|--------------------------|----|-----|
|           |                       |      | TSA        | GSP      |                                |      |                          |    |     |
| JUNÍN     | <i>Aeromonas</i> spp. | R3   | Sí<br>SPA  | Sí<br>VA | Circular 2mm,<br>blanquecinas  | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | B4   | Sí<br>PM   | Sí<br>VA | Circular, 2mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | R14  | Sí<br>SPA  | Sí<br>VA | Circular, 2mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | R17  | Sí<br>SPA  | Sí<br>VA | Circular, 3mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | R5   | Sí<br>SPA  | Sí<br>VA | Circular, 2mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | B19  | Sí<br>SPA  | Sí<br>VA | Circular, 3mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | B20  | Sí<br>SPA  | Sí<br>VA | Circular, 2mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
| CAJAMARCA | <i>Aeromonas</i> spp. | B11  | Sí<br>NP   | Sí<br>VA | Circular, 2mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | R9   | Sí<br>NP   | Sí<br>VA | Circular, 3mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | B9   | Sí<br>NP   | Sí<br>VA | Circular, 2mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | R10  | Sí<br>NP   | Sí<br>VA | Circular, 3mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |
|           |                       | B12  | Sí<br>SPA  | Sí<br>VA | Circular, 2mm,<br>blanquecinas | –    | Bacilos y<br>cocobacilos | +  | +   |

R= Riñón anterior; B= Bazo; PM= Forma pigmento marrón; SPA= Sin pigmentación aparente; NP= No forma pigmentos; VA = Viraje amarillo.

#### 4.2.2. Caracterización bioquímica

En este paso se caracterizó bioquímicamente a las 12 cepas aisladas del género *Aeromonas* para la cual se utilizó un conjunto de pruebas bioquímicas basándose en un sistema no automatizado. Todas las cepas *Aeromonas* sp. presentaron similitudes las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa (OX) y catalasa (CAT) positivas, hemólisis beta (HE $\beta$ ) en agar sangre, arginina deshidrogenasa (ADH) positivas, reducción de nitratos (NIT), metabolismo de la glucosa (GLU), el manitol (MAN), degradación de la gelatina (GEL) y ureasa negativas (URE).

Las cepas R3, B4, R14 y R17 de Junín no presentaron motilidad (MOT) en medio SIM y eran indol negativos (presuntivos a *A. salmonicida*), mientras las cepas R5, B19, B20 de Junín y R9, B9, R10, B11 y B12 de Cajamarca eran móviles e indol positivos (característico de *Aeromonas* móviles). Las cepas *Aeromonas* sp. presentaron resultados que diferían o eran variables para las pruebas bioquímicas: lisina descarboxilasa (LDC), ornitina descarboxilasa (ODC), lactato (LAC), citrato (CIT) y producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) relacionado a lo descrito por Abbott *et al.* (2003) y Buller (2014) (Cuadro 8 y 9).

**Cuadro 8.** Caracterización bioquímica de cepas *Aeromonas* sp. aisladas de las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles y clínicamente enfermas de Junín.

| Junín                                           | Cepa                  | OX | CAT | HL $\beta$ | MOT | ODC | LDC | ADH | NIT | IND | CIT | URE | GLU | LAC | MAN | GEL | H <sub>2</sub> S |
|-------------------------------------------------|-----------------------|----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
| <b><i>Aeromonas</i> no móviles patógena</b>     |                       |    |     |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |
|                                                 | <i>A. salmonicida</i> | +  | +   | +          | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                 | R3                    | +  | +   | +          | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                 | B4                    | +  | +   | +          | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                 | R14                   | +  | +   | +          | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                 | B17                   | +  | +   | +          | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
| <b>Otras <i>Aeromonas</i> móviles patógenas</b> |                       |    |     |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |
|                                                 | <i>A. bestiarum</i>   | +  | +   | +          | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +                |
|                                                 | <i>A. veronii</i>     | +  | +   | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                 | R5                    | +  | +   | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                 | B19                   | +  | +   | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                 | B20                   | +  | +   | +          | +   | -   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +                |

(+\*): positivo en 60% de las cepas



**Cuadro 9.** Caracterización bioquímica de cepas *Aeromonas* sp. aisladas de las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles y clínicamente enfermas de Cajamarca.

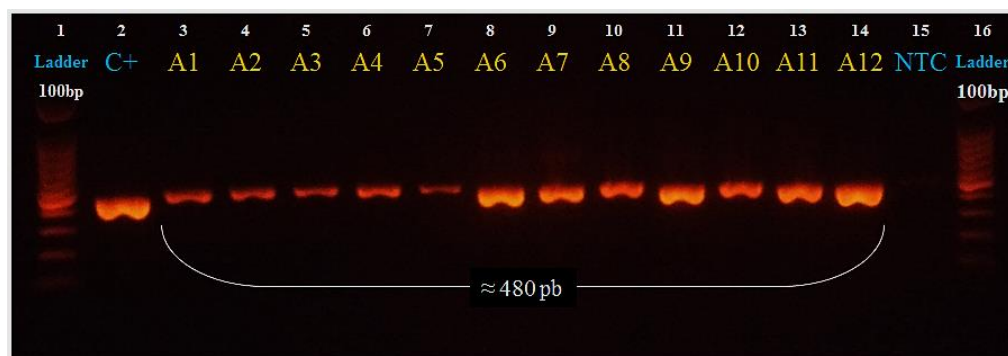
| Cajamarca                                                    | Cepa                 | OX | CAT | HL $\beta$ | MOT | ODC | LDC | ADH | NIT | IND | CIT | URE | GLU | LAC | MAN | GEL | H <sub>2</sub> S |
|--------------------------------------------------------------|----------------------|----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
| <b><i>Aeromonas</i> móviles (principal patógeno del MAS)</b> |                      |    |     |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |
|                                                              | <i>A. hydrophila</i> | +  | +   | +          | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                              | B11                  | +  | +   | +          | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
| <b>Otras <i>Aeromonas</i> móviles patógenas</b>              |                      |    |     |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                  |
|                                                              | <i>A. bestiarum</i>  | +  | +   | +          | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +                |
|                                                              | <i>A. veronii</i>    | +  | +   | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                              | R9                   | +  | +   | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                              | B9                   | +  | +   | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |
|                                                              | R10                  | +  | +   | +          | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +                |
|                                                              | B12                  | +  | +   | +          | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | +   | +   | -                |

(+\*): positivo en 60% de las cepas

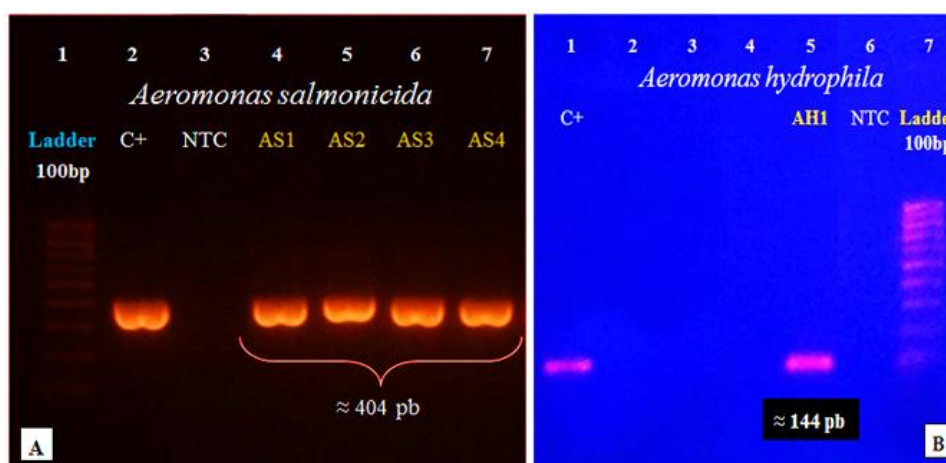
La interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas permitió discriminar las cepas de *Aeromonas* no móviles (como las cepas típicas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*), de las *Aeromonas* móviles (como las cepas de las presuntas *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. bestiarum*). Además, dentro de las cepas caracterizadas como *Aeromonas* móviles se observaron perfiles bioquímicos similares a cepas de *A. hydrophila* (que posteriormente se confirmó mediante técnicas moleculares) así como cepas presuntivas a *A. veronii* y *A. bestiarum* (Buller, 2014).

#### 4.3. Identificación molecular

Se realizó PCR convencional (reacción en cadena de la polimerasa) a partir de las colonias de las presuntas *Aeromonas* obtenidas en la caracterización bioquímica. Para la identificación molecular de *Aeromonas* sp. se buscó obtener un producto de 480 pb. Para detectar *A. salmonicida* se generó un producto de 404 pb y para *A. hydrophila*, un producto de 144 pb. Los resultados indican que 7 cepas de Junín (R3, B4, R5, R14, R17, B19 y B20) y 5 cepas de Cajamarca (R9, B9, R10, R11 y B12) se engloban dentro del género *Aeromonas* (Figura 10). Posteriormente, se identificó que las cepas R3, B4, R14 y R17 de Junín fueron positivas a *A. salmonicida*, mientras que la cepa B11 de Cajamarca fue positiva a *A. hydrophila* (Figura 11).



**Figura 10.** Electroforesis de producto de PCR de aislados *Aeromonas* sp. Columna 1 y 16: Ladder; Columna 3 - 14: aislados; Columna 2: control positivo; Columna 3: control negativo.



**Figura 11.** Electroforesis de producto de PCR (A) de *A. salmonicida*: Columna 4 – 7 y (B) de *A. hydrophila*: Columna 5. Ladder: Columna 1 (A) y 7 (B); NTC: Columna 3 (A) y 6 (B).

Posteriormente, se purificaron los productos de PCR para enviarlos a secuenciar empleando el servicio de Macrogen Inc., y se realizó el alineamiento mediante el software ClustalX. El análisis bioinformático efectuado a través de BLAST (NCBI) confirmó las cepas *Aeromonas* spp. y *A. salmonicida*, utilizando los marcadores moleculares ARNr 16S y *fstA* respectivamente, las cuales mostraron un porcentaje de similitud de 98 a 100% con las secuencias almacenadas en la base de datos NCBI. Además, la cepa de Cajamarca identificada previamente como *A. hydrophila* mediante pruebas bioquímicas y PCR convencional (empleando el marcador molecular *gyrB*), evidenció una identidad de 95,6% con *Aeromonas hydrophila* subespecie *dhakensis*.

#### 4.4. Análisis de los resultados

Las pruebas preliminares evidenciaron la presencia de bacterias del género *Aeromonas* en el agar GSP, las bioquímicas posteriores diferenciaron las cepas no móviles e indol negativos compatibles a *A. salmonicida*, de las cepas móviles e indol positivos relacionados a las *Aeromonas* móviles como *A. hydrophila*. Finalmente, la confirmación mediante PCR, secuenciación y BLAST demostró que doce cepas *Aeromonas* sp. provenían de Junín y Cajamarca (12/60), de éstas se identificaron 4 cepas *A. salmonicida* (4/60) de Junín y 1 cepa *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* de Cajamarca (1/60), además 7 cepas *Aeromonas* sp. de Junín (3) y Cajamarca (4) mostraron características bioquímicas relacionadas a otras *Aeromonas* móviles (cuadro 10).

Los aislados no consignados en el cuadro 10 fueron caracterizados como cepas presuntivas a *Yersinia ruckeri* (42/60), enterobacteria patógena de presentación frecuente en truchicultura, presentaron morfología bacilar formando filamentos, gramnegativas, OXI negativa, CAT positiva y se desarrollaron en TSA; mientras que las bacterias restantes (6/60), posibles contaminantes que se desarrollaron en medio TSA, eran grampositivas y presentaron morfología cocoide.

**Cuadro 10.** Frecuencia de las cepas del género *Aeromonas* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles, clínicamente enfermas de Junín y Cajamarca.

| Región    | Cepa bacteriana                              | Frecuencia | %   |
|-----------|----------------------------------------------|------------|-----|
| Junín     | <i>Aeromonas salmonicida</i>                 | 4/60       | 6,7 |
|           | Otras <i>Aeromonas</i> móviles patógenas     | 3/60       | 5,0 |
| Cajamarca | <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> | 1/60       | 1,7 |
|           | Otras <i>Aeromonas</i> móviles patógenas     | 4/60       | 6,7 |

## V. DISCUSIÓN

Esta investigación se orientó principalmente a la caracterización e identificación de cepas patógenas causantes de aeromoniasis en la truchicultura: *Aeromonas salmonicida* (forunculosis) y *A. hydrophila* (Septicemia por *Aeromonas* móviles). Austin y Austin (2007) y Dallaire-Dufresne *et al.* (2013) indican que este problema sanitario genera retraso en el crecimiento, inmunosupresión, signología diversa, alta morbilidad (80 a 100%) y mortalidad significativa (0 hasta 80%) resultando en pérdidas económicas para los truchicultores. Los experimentos realizados por Zepeda-Velásquez *et al.* (2017) en México, resaltan la patogenicidad de *A. salmonicida* y *A. hydrophila* para causar una mortalidad significativa (10 a 20%) en truchas arcoíris retadas.

Este estudio desarrolló un muestreo no probabilístico con los siguientes criterios de inclusión: truchas juveniles de acuicultura que presentaban signos clínicos compatibles con aeromoniasis (nado errático y comportamiento anómalo como orillamiento, melanosis, ulceraciones en la piel, aletas con presencia de zonas necróticas-hemorrágicas y abdomen distendido) provenientes de brotes recientes, características similares tomadas por Noga (2010) y Baca (2012), además este tipo de muestreo intencionado es recomendado por Padrós y Zarza (2005) y De Blas (2008) para el diagnóstico de enfermedades que se originan en brotes en acuicultura.

Al inicio de la necropsia se evaluó y registró las lesiones o características anómalas externas para cada animal muestreado hallándose lesiones compatibles a aeromoniasis tales como melanosis u oscurecimiento de la piel (47/60), zonas necróticas en las aletas (41/60), ulceraciones en la piel focales o multifocales (32/60), zonas hemorrágicas de tipo petequiral o equimótica en la base de las aletas (28/60) y distensión del abdomen (17/60), signología similar a la descrita por Cipriano (2001), Noga (2010) y Baca (2012). Además, como indica Zepeda-Velásquez (2015b), las lesiones externas halladas son compatibles tanto para forunculosis como para la Septicemia por *Aeromonas* móviles.

Prosiguiendo con la necropsia se efectuó la apertura de los especímenes y se pudo observar alteraciones patológicas macroscópicas internas tales como: incremento del tamaño del hígado o hepatomegalia (43/60), así como también aumento en el volumen del bazo o esplenomegalia (38/60) y diversas regiones del cuerpo donde se visualizó hemorragias petequiales como en la superficie hepática (26/60), en los ciegos pilóricos (10/60) y la grasa peritoneal (10/60). Estos hallazgos se correlacionan con las descripciones de Roberts (2001), Kozińska (2007) y Baca (2012) en sus estudios efectuados en truchas afectadas con aeromoniasis. Las alteraciones más resaltantes son las hemorragias de tipo petequeal o equimótica que se presentan en diversos órganos como riñón, bazo, hígado y tracto intestinal como lo describen Cipriano (2001) y Noga (2010).

Austin y Austin (2007) y Kozińska (2007) mencionan que en la patología ocasionada por *Aeromonas salmonicida*, no siempre conlleva la formación del forúnculo, sobre todo en infección aguda o subaguda, en peces juveniles y en brotes epidemiológicos; lo que coincide con los hallazgos de este estudio. De hecho, *A. hydrophila* también puede ocasionar lesiones forunculosas (Zepeda-Velásquez, 2015b). Además, en salmónidos como la trucha arcoíris la presentación de signos clínicos frente a una infección bacteriana cursa con signología general, no patognomónica (Kumar *et al.* 2015), que se asemeja a lo ocasionado por *Yersinia ruckeri* (Sierralta, 2011) o *Flavobacterium psychrophilum* (León *et al.*, 2008) que cursan con melanosis, esplenomegalia, hepatomegalia, lesiones hemorrágicas multifocales, entre otros anomalías del comportamiento.

La caracterización bioquímica se separó en dos fases. La primera fase buscó aislar cepas *Aeromonas* spp., en agar TSA y GSP (selectivo), y caracterizarlas observando la morfología macroscópica y microscópica, tinción de Gram, prueba de oxidasa y catalasa. Así, doce cepas de *Aeromonas* sp. provenientes de Junín y Cajamarca se desarrollaron en el agar GSP. El aislamiento de cepas de *Aeromonas* en la región Junín se correlacionan a lo hallado por IMARPE (2008) y Baca (2012). Sin embargo, hasta el momento no se habían reportado *Aeromonas* en truchas de cultivo en Cajamarca. La presentación del pigmento marrón soluble en TSA observado en una de las cuatro cepas *A. salmonicida*, descrito por Baca (2012) y Buller (2014), varía por el contenido de triptona y la termolabilidad de la hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, según lo descrito por Qiao *et al.* (2018).

La segunda fase usó un sistema no automatizado para caracterizar bioquímicamente cepas *Aeromonas* spp. y separarlas por especies, ya que los sistemas automatizados aún no discriminan las especies de *Aeromonas* con las de *Vibrio*, como lo mencionan Janda y Abbott (2010) y Latif-Eugenín (2016). Además, *Aeromonas* presentan una diversidad genética, bioquímica y antigénica que dificulta su caracterización patogénica (Cipriano, 2001). Así, la diferenciación se basó en la

prueba de motilidad (en medio SIM) e indol, ya que *A. salmonicida* es una bacteria no móvil e indol negativa, todo lo contrario a las *Aeromonas* móviles, como *A. hydrophila*. Se diferenciaron 4 cepas de Junín presuntivas a *A. salmonicida* y 8 *Aeromonas* móviles de Cajamarca. Las *Aeromonas* móviles reaccionaron variablemente a las pruebas ODC, LDC, LAC, CIT y H<sub>2</sub>S, lo que sugirió la presencia de *A. hydrophila*, además de perfiles bioquímicos similares a las cepas patógenas *A. veronii* y *A. bestiarum* como los descritos por Abbott *et al.* (2003), Baca (2012) y Buller (2014).

Latif-Eugenín (2016) menciona que para la caracterización e identificación de *Aeromonas*, el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP) recomienda un estudio polifásico que incluya estudios de fenotipo, genotipo, y actualmente, estudios filogenéticos. Así, Baca (2012) caracterizó bioquímicamente 7 cepas *A. salmonicida* y 1 cepa *A. hydrophila* de Junín, pero, en el Perú aún no se han identificado bioquímicamente o molecularmente otras especies de *Aeromonas* móviles que afectan las truchas arcoíris de acuicultura. Así, el presente estudio desarrolló tres protocolos de detección molecular, para *Aeromonas* sp., *A. salmonicida* y *A. hydrophila* (principal agente bacteriano en la Septicemia por *Aeromonas* Móviles).

Se emplearon *primers* (cebadores) específicos para la detección molecular de *Aeromonas* spp. (ARNr 16S), *A. hydrophila* (*gyrB*) basándose en el estudio efectuado por Persson *et al.* (2015). Para el caso de *A. salmonicida* se amplificó el gen *fstA*, diseñado por Beaz-Hidalgo *et al.* (2008), ya que marcadores moleculares como ARNr 16S o *gyrB* incluso identifican genotípicamente a otras *Aeromonas* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). La secuenciación de los productos del PCR y el análisis BLAST (NCBI) confirmaron las cepas *A. salmonicida* y *Aeromonas* spp., presentando una similitud de 98 a 100%, mientras la cepa B11 *A. hydrophila* de Cajamarca demostró una identidad de 95,6% con *Aeromonas hydrophila* subespecie *dhakensis*, siendo porcentajes de identidad aceptables como se indica en los estudios de Martínez-Murcia *et al.* (2009) y Latif-Eugenín (2016).

Este estudio utilizó *primers* para identificar las principales *Aeromonas* patógenas que afectan la truchicultura como lo describe Cipriano (2001), Noga (2010) y Baca en Junín (2012). Para esclarecer la divergencia genética a nivel intraespecie o interespecie de *A. hydrophila* y de otras *Aeromonas* móviles, Martínez-Murcia *et al.* (2011) recomiendan el empleo de genes como *gyrB* (empleado en esta tesis), *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* y *atpD*. Así, Beaz-Hidalgo *et al.* (2013b) y Colston *et al.* (2014) empleando estudios filogenéticos reclasificaron *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, en *A. dhakensis* (estrechamente relacionado a *A. hydrophila*). Chen *et al.* (2016) indican que este microorganismo se distribuye en ambientes acuáticos de áreas tropicales y subtropicales, aislado de muestras de peces y humanos enfermos, demostrando una marcada virulencia para el

desarrollo de bacteriemias e infecciones clínicas, descripciones que se asocian a la cepa aislada en Cajamarca.

Las 7 cepas de *Aeromonas* móviles (identificadas como *Aeromonas* sp.) presentaban perfiles bioquímicos similares a las cepas patógenas *A. veronii* y *A. bestiarum*. Esto se conjetura por las diferencias en las pruebas bioquímicas: ODC positivo y LAC negativo como presuntivo a *A. veronii* mientras LAC positivo y H<sub>2</sub>S positivo como presuntivo a *A. bestiarum*, de acuerdo a lo descrito por Buller (2014). La idea de una infección natural ocasionada por distintas especies de *Aeromonas* es descrita por Baca en Junín (2012) y se ve reforzada por las descripciones de coinfección en peces de cultivo realizadas por Kozińska y Pekala (2012) y por Zepeda-Velásquez *et al.* (2015a) quienes identificaron molecular e histopatológicamente *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. veronii* cohabitando e infectando truchas arcoíris de cultivo con signos clínicos de enfermedad.

El elevado aislamiento de colonias gramnegativas en medio TSA (42/60), se debió a *Yersinia ruckeri*, enterobacteria de frecuente presentación en la truchicultura del Perú, causante de yersiniosis (“enfermedad de la boca roja”) que genera signología similar (melanosis, esplenomegalia, hepatomegalia y hemorragias multifocales) y ha sido reportada en diversos estudios como el de Fernández (2011), Sierralta (2011) y Sirvas *et al.* (2011). Así, en la casuística del Laboratorio de Ictiología (FMV-UNMSM) se ha identificado *Y. ruckeri* además de *Flavobacterium psychrophilum*, causante de la enfermedad bacteriana del agua fría, ambas con signología similar; ergo, debe efectuarse el diagnóstico diferencial con estas enfermedades bacterianas, la caracterización por bioquímica y la identificación molecular.

Para concluir, el estudio demostró que distintas especies de *Aeromonas* causan aeromoniasis en truchas arcoíris en una misma piscigranja además pueden existir infecciones mixtas, especialmente con *Yersinia ruckeri*, tornándose un problema sanitario relevante que afecta a la incipiente y poco tecnificada truchicultura nacional. Se precisan más estudios que identifiquen molecularmente, o incluso filogenéticamente, las distintas especies de *Aeromonas* que afectan el desarrollo de la acuicultura peruana, en especial *Aeromonas* patógenas de truchas arcoíris. Así, el aporte de información científica sentarán las bases de investigaciones posteriores que serán de gran utilidad para la mejora de los programas de control, bioseguridad y prevención que se desarrollen en este importante y creciente sector productivo nacional.

## VI. CONCLUSIONES

- *Aeromonas salmonicida* está presente en las piscigranjas de Junín mientras *Aeromonas hydrophila* subespecie *dhakensis*, en las de Cajamarca; además, ambas bacterias causan signología asociada a aeromoniasis en las truchas arcoíris juveniles y se presentan en baja frecuencia.
- Existe la presencia de otras especies de *Aeromonas* móviles, distintas a *A. hydrophila*, en las piscigranjas de Junín y Cajamarca; además, están involucradas en el desarrollo de aeromoniasis en las truchas arcoíris juveniles y se presentan en baja frecuencia.



## VII. REFERENCIAS

**Abbott SL, Cheung WK, Janda JM. 2003.** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J Clin Microbiol 41: 2348-2357.

**Aravena-Roman M, Beaz-Hidalgo R, Inglis TJ, Riley TV, Martinez-Murcia AJ, Chang BJ, Figueras MJ. 2013.** *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water in Western Australia. Int J Syst Evol Microbiol 63: 2270–2276.

**Arnesen KR, Mikkelsen H, Schrøder MB, Lund V. 2010.** Impact of reattaching various *Aeromonas salmonicida*. A-layer proteins on vaccine efficacy in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Vaccine 28: 4703–4708.

**Austin B, Austin D. 2007.** Bacterial fish Pathogens. Diseases in Farmed and Wild fish. 4<sup>a</sup> Ed. UK: Springer. 552 p.

**Baca, RF. 2012.** Aislamiento e identificación bioquímica de *Aeromonas salmonicida* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en fase juvenil en una piscigranja de la región Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 77 p.

**Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. 2012.** Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. En: Health and Environment in Aquaculture. Brasil: Carvalho E. 97-132.

**Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Figueras MJ. 2013a.** The improved PCR of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other *Aeromonas* especies. Vet Microbiol 166 (3-4): 359-363.

**Beaz-Hidalgo R, Magi GE, Balboa S, Barja JL, Romalde JL. 2008.** Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fst* (ferric siderophore receptor) gene. Vet Microbiol 128 (3-4): 386-394.

**Beaz-Hidalgo R, Martinez-Murcia A, Figueras MJ. 2013b.** Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys *et al.*, 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martinez-Murcia *et al.*, 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. Syst Appl Microbiol 36: 171–176.

**Behnke RJ. 1992.** Native Trout of Western North America. Maryland: American Fisheries Society Monograph 6. 275 p.

**Bergh Ø. 2008.** Bacterial diseases of fish. En: Eiras JC, Segner H, Wahli T, Kapoor BG (eds.), Fish Diseases. Science Publishers. 239–277.

**Blanco M. 1994.** La Trucha, cría industrial. 2ª Ed. Madrid: Mundi. 76p.

**Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. 2001.** The *Archaea* and the deeply branching and Phototrophic *Bacteria*. En: Garrity GM (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. 2ª ed. New York: Springer. 1-721.

**Boyd J, Williams J, Curtis B, Kozera C, Singh R, Reith M. 2003.** Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449. Plasmid 50: 131–144.

**Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT. 2005.** The Proteobacteria. Part A: Introductory Essays. En: Garrity GM (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. 2ª ed. New York: Springer. 1-304.

**Brown L. 2000.** Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. España: Acribia. 460 p.

**Buller NB. 2014.** Bacteria and Fungi from fish and other aquatic animals, a practical identification manual. 2ª ed. UK: Editorial CABI. 881 p.

**Burr SE, Frey J. 2007.** Analysis of type III effector genes in typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. J Fish Dis 30: 711–714.

**Burr SE, Pugovkin D, Wahli T, Segner H, Frey J. 2005.** Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. Microbiology 151: 2111–2118.

**CABI: Invasive Species Compendium. 2018.** *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout). En: Invasive Species Compendium. [Internet]. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc>.

**Castro–Escarpulli G, Aguilera Arriola G, Gionio Cerezo S, Hernández Rodríguez CH, Rodríguez Chacón M, Soler Falgas L, Aparicio Ozores G, Figueras Salvat MJ. 2002.** El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México?. Asoc. Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Enf. Infecciosas y Microbiología. 22 (4): 206-216.

**Castro–Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Arteaga-Caribay NI, Carmona-Martínez AA, Pérez-Valdespino A. 2003.** La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad en la microbiología diagnóstica. Bioquímica 28: 11-18.

**CCAC: Canadian Council on Animal Care. 2010.** CCAC Guidelines on: Euthanasia of animals used in science. 1st ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 36p.

**Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. 2007.** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods 69: 330-339.

**Chen PL, Lamy B, Ko WC. 2016.** *Aeromonas dhakensis*, an increasingly recognized human pathogen. Front Microbiol 7: 793.

**Cipriano RC, Austin B. 2011.** Furunculosis and other Aeromonad diseases. In: Woo PTK, Bruno DW (eds.), Fish Diseases and Disorders. CAB International. 435–494.

**Cipriano RC, Bullock GL. 2001.** Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. Fish Disease Leaflet 66. 33 p.

**Cipriano RC. 2001.** *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Fish Dis Leaflet. 68: 1-25.

**Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Gogarten JP, Graf J. 2014.** Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. MBio 5: e02136.

**Colwell RR, MacDonell MR, De Ley J. 1986.** Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. Int J Syst Bacteriol. 36: 473-477.

**Crawford S, Muir A. 2008.** Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007. Reviews in Fish Biology and Fisheries 18: 313-344.

**Daher RK, Filion G, Tan SG, Dallaire-Dufresne S, Paquet VE, Charette SJ. 2011.** Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. Vet Microbiol 152: 353–360.

**Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. 2013.** Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. Vet Microbiol 169: 1-7.

**De Blas. 2008.** Estudio de la enfermedad en poblaciones acuáticas: Epidemiología acuática. Seminario sobre agrupaciones de defensa sanitaria en piscicultura marina. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

**Duarte AS, Cavaleiro E, Pereira C, Merino S, Esteves AC, Duarte EP, et al. 2015.** *Aeromonas piscicola* AH-3 expresses an extracellular collagenase with cytotoxic properties. Lett Appl Microbiol 60: 288–297.

**FAO. 2005.** Visión general del sector acuícola nacional – Perú. Texto de Soto-Cardenas, GI. en Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org>

**FAO. 2005-2018.** Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oncorhynchus mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Texto de Cowx IG. En: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Roma. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org>

**FAO. 2008.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Department [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org>

**FAO. 2010. Visión** general del sector pesquero Nacional - Perú. Roma: 24 p. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org>

**FAO. 2016.** Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura 2016. Roma: 213 p.

**FAO. 2016.** Una Mirada al Extensionismo Acuícola en América Latina y el Caribe, por Flores-Nava, A.; A. Mena; D. Mendoza y A. Fuenzalida. Santiago de Chile: 81 p.

**FAO. 2018.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma: 233 p.

**Farmer JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW. 2006.** The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria. New York: Springer Science Business Media. 564-596.

**Fernandez AI, Fernandez AF, Perez MJ, Nieto TP, Ellis AE. 1998.** Siderophore production by *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*, Lack of strain specificity. Dis Aquat Org 33: 87-92

**Fernández C. 2011.** Determinación de *Yersinia ruckeri* y sus características lesionales anatómo - histopatológicas en truchas Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa pre-comercial en una piscigranja de la región Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 69 p.

**Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Collado L, Martínez-Murcia AJ. 2011.** Point of view on the recommendations for new bacterial species description and their impact on the genus *Aeromonas* and *Arcobacter*. Bol. Bergey's Int. Soc. Microb. Syst. 2 (1): 1–16.

**FONDEPES. 2006.** Manual de cultivo de truchas arcoíris en jaulas. Lima: Fondepes. 87 p. [Internet]. Disponible en: <https://www.fondepes.gob.pe>

**FONDEPES. 2014.** Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales. 1ª Ed. Lima: EINS Perú. 86p.

**FONDEPES. 2017.** Cultivo de la trucha arcoíris en el Peru con énfasis en la importación de ovas embrionadas y la comercialización de la producción. Lima: Fondepes. 32 p.

**Harikrishnan R, Balasundaram C. 2005.** Modern Trends in *Aeromonas hydrophila*: Disease Management with Fish. Reviews in Fisheries Science 13 (4): 281-320.

- Hatha M, Vivekanandhan AA, Joice GJ, Christo I. 2005.** Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *Int J Food Microbiol* 98: 131–134.
- Havelaar AH, During M, Versteegh JF. 1978.** Ampicillin-dextrin agar médium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J Appl Bacteriol* 62: 279-287.
- Hiney M, Olivier G. 1999.** Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). En: Woo PTK, Bruno DW, eds. *Fish Diseases and Disorders. Vol 3. Viral, Bacterial, Fungal Infections*. Wallingdorf UK: CAB International. 341-425.
- Hiney M, Smith P, Bernoth EM. 1997.** Covert *Aeromonas salmonicida* Infections: Furunculosis. En: Anderson DP, Aoki T, Bernoth EM, Ellis AE, (Eds.). USA: Academic Press 54-97.
- Hossain MJ. 2012.** Molecular Interactions between Phage and the Catfish Pathogen *Edwardsiella ictaluri* and Comparative Genomics of Epidemic Strains of *Aeromonas hydrophila*. Tesis de doctorado. Auburn: Universidad de Auburn. 210 p.
- IMARPE, Instituto del Mar del Perú. 2008.** Anuario Científico Tecnológico 2008. Vol 8. Callao: Instituto del Mar del Perú. 176p.
- INCAGRO. 2008.** Manual para la producción de truchas en jaulas flotantes. Huancavelica - Perú. 60 p.
- Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR. 1993.** *Bacterial Diseases of Fish*. Toronto: Halsted Press Wiley 122-155.
- Iregui C. 2007.** Manual de Sanidad Piscícola. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 7-22.
- Janda J, Abbott S. 2010.** The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 23 (1): 35-73.
- John A, Hanson P, Hanson LA. 2011.** Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3ª ed. USA: Wiley- Blackwell. 293-300.

- Kirkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O. 2003.** Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. J Vet Med B 50: 339-342.
- Kozińska A, Pekala A. 2012.** Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. ScientificWorldJournal 2012: 949358
- Kozińska A. 2007.** Dominant pathogenic species of mesophilic Aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J Fish Dis 30: 293-301.
- Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Veterinary Research 46: 2-6.
- La Patra SE, Plant KP, Alcorn S, Ostland V, Winton J. 2010.** An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 33: 143-151.
- Latif-Eugenín FL. 2016.** *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. Tesis de doctorado. España: Universitat Rovira I Virgili. 391 p.
- Lázara A. 2007.** Estudio Taxonómico de *Aeromonas* móviles y salicina negativas. Tesis de doctorado. España: Universidad de Valencia. 343 p.
- León J, Avalos R, Ponce M. 2008.** *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. Revista Peruana de Biología 15(2): 117-124
- Li J, Ni XD, Liu YJ, Lu CP. 2011.** Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. J Appl Microbiol 110: 823–830.
- Lund V, Espelid S, Mikkelsen H. 2003.** Vaccine efficacy in spotted wolffish *Anarhichas minor*: relationship to molecular variation in A-layer protein of atypical *Aeromonas salmonicida*. Dis Aquat Org 56: 31–42.
- Mantilla B. 2004.** Acuicultura: Cultivo de truchas en jaulas flotantes. 1ª ed. Lima: Palomino. 34–37.

**Martín–Carnahan A, Joseph SW. 2005.** Order XII. Aeromonadales ord. nov. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT y Garrity GM. EEUU: Springer. 556-578.

**Martín–Carnahan A, Joseph SW. Family I. 2005.** Aeromonadaceae. Colwell, MacDonell and DeLey (1986). In: Brennan DJ, Krieg NR, Staley JT, *et al.* (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. 2ª ed. New York: Springer. 556–578.

**Martínez MJ, Simon-Pujol D, Congregado F. 1995.** The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. FEMS Microbiol Lett 128: 69–73.

**Martínez-Murcia A, Monera A, Alperi A, Figueras MJ, Saavedra MJ. 2009.** Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. Curr Microbiol 58: 76–80.

**Martínez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. 1992.** Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. Int J Syst Bacteriol 42: 412-421.

**Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, López-Alvarez M, Lara E, *et al.* 2011.** Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. Syst Appl Microbiol 34: 189–199.

**McPhail JD, Lindsey CC. 1970.** Freshwater Fishes of Northwestern Canada and Alaska. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada. Bol. 173. 381 p.

**Meik S, Tiscornia J, Arias M, Kien MC, Pellerano G. 2011.** Infección cutánea por *Aeromonas*. Med Cutan Iber Lat Am. 39: 23-25.

**Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Saleh M, El-Matbouli M. 2016.** Review: *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. Dis Aquat Org 120: 49–68.

**Mendoza, D. 2013.** Informe: Situación del Extensionismo Acuícola en el Perú. Dirección de Acuicultura – PRODUCE. Lima: PRODUCE. 14 p.



**Nam IY, Joh KJ. 2007.** Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. Rapid J Microbiol 45: 297-304.

**Navarro A, Martínez-Murcia A. 2018.** Phylogenetic analyses of the genus *Aeromonas* based on housekeeping gene sequencing and its influence on systematics. J Appl Microbiol 125: 622-631

**Noga EJ. 2010.** Fish Disease, Diagnosis & treatment. 2ª ed. USA: Wiley-Blackwell. 410 p.

**NTP. Norma Técnica Peruana 320.004-2014. 2014.** Acuicultura - Buenas Prácticas acuícolas en la producción de truchas arcoíris. [Internet]. Disponible en: <http://rnia.produce.gob.pe>

**Ortega C, Ania S, Claver R. 2002.** Estudio comparativo de la eficacia de un antibiótico y un potenciador de la inmunidad innata en el control de los brotes de la forunculosis (*Aeromonas salmonicida*) en trucha común (*Salmo trutta*). Departamento de Patología Infecciosa y Epidemiología. Universidad Autónoma de México. 7-15p

**Ostrande GK. 2000.** The Laboratory fish. San Diego: Academy Press. 678 p.

**Padrós F, Zarza C. 2005.** Manual de técnicas básicas de diagnóstico patológico en peces. V curso de ictiopatología: Prácticas para piscicultores. España: Universidad Autónoma de Barcelona. 18-19.

**Pang MB, Jiang JW, Xie X, Wu YF, Dong YH, Kwok HAY, Zhang W, Yao AHC, Lu CP, Leung FC, Liu YJ. 2015.** Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. Sci Rep 5: 9833. doi: 10.1038/srep09833

**Persson S, Al-Shuweli S, Yapici S, Jensen JN, Olsen KEP. 2015.** Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. J Clin Microbiol 53: 653-656.

**Plumb JA, Hanson LA. 2011.** Health Maintenance and Principal: Microbial Diseases of Cultured Fishes. 3ª ed. Iowa: Wiley-Blackwell. 492 p.

**PRODUCE. 2016.** Estudio de Preinversión a nivel factibilidad del Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura PROG-19-2014-SNIP. Lima: PRODUCE. 383 p.

**PRODUCE. 2018.** Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2016. Lima: PRODUCE. Informe anual estadístico. 202 p.

**PROMPERU. 2018.** Boletín Mensual del Departamento de Productos Pesqueros - Febrero 2018. Departamento de Productos Pesqueros. Lima: PROMPERU. 10 p.

**Qiao Y, Wang J, Wang H, Chai B, Rao C, Chen X, Du S. 2018.** 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Thermolability Is Responsible for Temperature-Dependent Melanogenesis in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Appl Environ Microbiol 85: e01926-18

**RAGASH. Municipalidad Distrital Ragash. 2009.** Manual de Crianza: trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Ragash-Perú. 25p.

**Rahman M, Huys G, Rahman M, Albert MJ, Kuhn I, Molby R. 2007.** Persistence, transmission, and virulence characteristics of *Aeromonas* strains in a duckweed aquaculture-based hospital sewage water recycling plant in Bangladesh. Appl Environ Microbiol 73: 1444-1451.

**Rasch M, Kastbjerg VG, Bruhn JB, Dalsgaard I, Givskov M, Gram L. 2007.** Quorum sensing signals are produced by *Aeromonas salmonicida* and quorum sensing inhibitors can reduce production of a potential virulence factor. Dis Aquat Org 78: 105–113.

**Rasmussen-Ivey CR, Figueras MJ, McGarey D and Liles MR. 2016** Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. Front Microbiol 7: 1337.

**Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch A, Kimball J, Munholland J, Murphy C, Sarty D, Williams J, Nash JH, Johnson SC, Brown LL. 2008.** The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. BMC Genomics 9: 427.

**Roberts RJ. 2001.** Fish Pathology. 3<sup>a</sup> ed. London: WB Saunders. 472 p.

**Saavedra MJ, Guedes-Novais S, Alves A, Rema P, Tação M, Correia A, Martínez-Murcia A. 2004.** Resistance to beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int Microbiol 7: 207-211.

**Saldarriaga M., Regalado F. 2017.** Potencial Acuícola en el Perú. Revista Moneda (BCRP) 172: 34–39.

**Salie K, Resoort D, Du Plessis D, Maleri M. 2008.** Training manual for small-scale rainbow trout farmers in net cages on irrigation dams: water quality, production and fish health. Cape Town - Republic of South Africa. 25 p.

**SANIPES. 2016.** Programa Oficial de Vigilancia y Control de enfermedades en animales acuáticos: P01-SDSNA-SANIPES. [Internet]. Disponible en: <https://www.sanipes.gob.pe>

**SANIPES. 2018.** Presencia del Virus de la Tilapia Lacustre (TILV) en el Perú. COMUNICADO N° 018 - 2018 – SANIPES. [Internet]. Disponible en: <http://www.sanipes.gob.pe>

**Sierra JC, Suarez G, Sha J, Baze WB, Foltz SM, Chopra AK. 2010.** Unraveling the mechanism of action of a new type III secretion system effector AexU from *Aeromonas hydrophila*. Microb Pathog 49: 122–134.

**Sierralta V. 2011.** Estado situacional de *Yersinia ruckeri* causante de “la enfermedad entérica de la boca roja” en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) en piscigranjas de la sierra central del Perú. Tesis de maestría. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 78 p.

**Sirvas S, Sánchez C, Peña C. 2011.** Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. Rev peru biol 18 (3): 349-353.

**Smith GR, Stearley RF. 1989.** The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts. Fisheries 14: 4–10.

**Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity Gm, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossellólmóra R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. 2002.** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol 52: 1043-1047.

**Subasinghe R, Soto D, Jia J. 2009.** Global aquaculture and its role in sustainable development. Reviews in Aquaculture 1 (1): 2-9.

**Tomás JM. 2012.** Review Article The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. ISRN Microbiology. 22 p. doi:10.5402/2012/256261

**Vilches S, Jimenez N, Tomas JM, Merino S. 2009.** *Aeromonas hydrophila* AH-3 type III secretion system expression and regulatory network. *Appl Environ Microbiol* 75: 6382–6392.

**Woynarovich A, Hoisty G, Moth-Poulsen T. 2011.** Small-scale rainbow trout farming. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Department [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org>

**Yang X, Yang QQ, Guo QY, Yi CY, Mao HP, Lin JX, Jiang ZP, Yu XQ. 2008.** *Aeromonas salmonicida* peritonitis after eating fish in a patient undergoing CAPD. *Perit Dial Int* 28: 316-317.

**Yapuchura A. 2006.** Producción y comercialización de truchas en el departamento de Puno y nuevo paradigma de producción. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Nacional de San Marcos. 164 p.

**Yu HB, Kaur R, Lim SM, Wang XH, Leung KY. 2007.** Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1. *Proteomics* 7: 436–449.

**Zepeda-Velásquez AP, Vega-Sánchez V, Salgado-Miranda C, Soriano-Vargas E. 2015a.** Histopathological findings in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with 3 different *Aeromonas* species. *Can J Vet Res* 79 (3): 250-254

**Zepeda-Velásquez AP. 2015b.** *Aeromonas* spp.: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *Revista AquaTIC* 42: 1-16.

**Zepeda-Velázquez AP, Vega-Sánchez V, Ortega-Santana C, Rubio-Godoy M, Montes de Oca-Mira D, Soriano-Vargas E. 2017.** Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Acta Tropica* 169: 122–124.

## **VIII. ANEXOS**

**Anexo 1.** Reporte de las lesiones macroscópicas visualizadas en la necropsia de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles clínicamente enfermas de piscigranjas de 4 regiones del Perú, periodo 2017 - 2018.

| Lesiones macroscópicas |                                           | Junín         |   |   |   |   |   |   |   |   |    |               |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------------------|-------------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                        |                                           | Piscigranja 1 |   |   |   |   |   |   |   |   |    | Piscigranja 2 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|                        |                                           | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11            | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| EXTERNAS               | Melanosis de la piel                      | X             | X | X | X | X | X | X | X |   | X  |               | X  | X  | X  |    | X  | X  | X  | X  | X  |
|                        | Necrosis de aletas                        |               | X | X |   | X |   |   | X | X | X  | X             |    | X  |    | X  | X  | X  | X  | X  | X  |
|                        | Ulceraciones epiteliales                  | X             |   | X | X |   | X |   |   |   |    | X             | X  |    | X  | X  |    | X  |    |    | X  |
|                        | Hemorragia en aletas                      |               |   | X | X | X |   | X |   | X |    |               | X  | X  |    |    | X  |    | X  |    | X  |
|                        | Distensión abdominal                      |               |   |   |   | X |   |   |   |   |    |               |    |    | X  | X  |    | X  |    | X  |    |
| INTERNAS               | Hepatomegalia                             | X             | X | X | X |   | X | X |   | X | X  | X             |    | X  | X  | X  |    | X  |    | X  |    |
|                        | Esplenomegalia                            |               | X | X | X | X | X |   | X |   | X  |               | X  |    | X  |    | X  |    | X  |    | X  |
|                        | Hemorragia petequiral en hígado           | X             |   | X | X |   |   | X |   | X |    | X             |    | X  |    |    |    | X  |    | X  |    |
|                        | Hemorragia petequiral en ciegos pilóricos |               |   |   | X |   |   |   |   |   |    |               |    |    | X  |    |    | X  |    |    |    |
|                        | Hemorragia petequiral en grasa peritoneal |               |   |   | X |   |   |   |   |   |    |               |    |    | X  |    |    | X  |    |    |    |

| Lesiones macroscópicas |                                           | Pasco         |   |   |   |   |   |   |   |   |    |               |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------------------|-------------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                        |                                           | Piscigranja 3 |   |   |   |   |   |   |   |   |    | Piscigranja 4 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|                        |                                           | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11            | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| EXTERNAS               | Melanosis de la piel                      | X             | X |   | X |   | X | X | X | X | X  |               | X  | X  | X  |    | X  | X  |    | X  | X  |
|                        | Necrosis de aletas                        | X             |   | X |   | X | X |   | X | X | X  | X             |    | X  |    | X  | X  |    | X  | X  |    |
|                        | Ulceraciones epiteliales                  |               | X |   | X |   |   | X |   |   |    | X             | X  |    | X  | X  |    | X  | X  |    | X  |
|                        | Hemorragia en aletas                      |               | X |   | X |   | X |   | X |   | X  |               | X  |    | X  |    | X  |    |    |    |    |
|                        | Distensión abdominal                      |               |   | X |   | X |   | X |   |   |    |               |    | X  |    | X  |    |    |    | X  |    |
| INTERNAS               | Hepatomegalia                             | X             |   | X |   | X |   | X | X |   | X  | X             | X  | X  | X  | X  | X  |    | X  | X  |    |
|                        | Esplenomegalia                            |               | X |   | X |   | X |   | X | X |    | X             |    | X  | X  |    | X  |    | X  | X  | X  |
|                        | Hemorragia petequiral en hígado           | X             | X |   |   | X |   | X |   |   | X  |               | X  |    |    | X  |    | X  |    | X  |    |
|                        | Hemorragia petequiral en ciegos pilóricos |               |   | X |   |   |   |   |   | X |    |               |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |
|                        | Hemorragia petequiral en grasa peritoneal |               |   | X |   |   |   |   |   | X |    |               |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |

| Lesiones macroscópicas |                                           | Cajamarca     |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | Ancash        |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|-------------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|---------------|---|---|---|---|---|---|---|
|                        |                                           | Piscigranja 5 |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | Piscigranja 6 |   |   |   |   |   |   |   |
|                        |                                           | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| EXTERNAS               | Melanosis de la piel                      |               | X | X | X |   | X | X | X | X | X  |    | X  | X             | X |   | X | X | X |   | X |
|                        | Necrosis de aletas                        | X             |   |   | X | X | X |   | X |   | X  | X  | X  | X             |   | X | X |   | X | X | X |
|                        | Ulceraciones epiteliales                  | X             |   | X |   | X |   | X | X | X |    | X  |    |               | X | X |   | X |   | X | X |
|                        | Hemorragia en aletas                      |               | X | X |   | X |   | X | X |   | X  |    | X  |               | X |   | X |   | X |   |   |
|                        | Distensión abdominal                      |               | X |   |   |   | X |   |   | X |    | X  |    | X             |   |   |   | X |   |   |   |
| INTERNAS               | Hepatomegalia                             | X             | X |   | X |   | X | X | X |   | X  | X  |    | X             | X |   | X | X | X |   | X |
|                        | Esplenomegalia                            | X             |   | X | X | X |   |   | X | X | X  | X  | X  |               | X | X |   | X |   | X | X |
|                        | Hemorragia petequiral en hígado           |               | X |   |   | X |   |   |   |   | X  | X  | X  | X             |   | X |   |   | X |   |   |
|                        | Hemorragia petequiral en ciegos pilóricos |               |   |   |   |   |   |   |   | X |    | X  | X  |               |   |   |   | X |   |   |   |
|                        | Hemorragia petequiral en grasa peritoneal |               |   |   |   |   |   |   |   | X |    | X  | X  |               |   |   |   | X |   |   |   |



**Anexo 2.** Descripción de los aislados bacterianos obtenidos de bazo (B) y riñón anterior (R) de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles clínicamente enfermas originarias de piscigranjas de 4 regiones del Perú, periodo 2017 - 2018.

| Lugar |               | Pez | Órgano | Cepa | TSA | GSP | Colonia                     | Forma/Gram     | OX | CAT |
|-------|---------------|-----|--------|------|-----|-----|-----------------------------|----------------|----|-----|
| JUNIN | PISCIGRANJA 1 | 1   | Riñón  | R1   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B1   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 2   | Riñón  | R2   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B2   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 3   | Riñón  | R3   | Sí  | Sí  | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | +  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B3   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 4   | Riñón  | R4   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B4   | Sí  | Sí  | Circular, 3mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | +  | +   |
|       |               | 5   | Riñón  | R5   | Sí  | Sí  | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | +  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B5   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 6   | Riñón  | R6   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B6   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 7   | Riñón  | R7   | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B7   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 8   | Riñón  | R8   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B8   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 9   | Riñón  | R9   | Sí  | No  | Circular, 1mm               | Cocos (+)      |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B9   | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 10  | Riñón  | R10  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B10  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       | PISCIGRANJA 2 | 11  | Riñón  | R11  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B11  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 12  | Riñón  | R12  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B12  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 13  | Riñón  | R13  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B13  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 14  | Riñón  | R14  | Sí  | Sí  | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | +  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B14  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 15  | Riñón  | R15  | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B15  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 16  | Riñón  | R16  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B16  | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas       | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 17  | Riñón  | R17  | Sí  | Sí  | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | +  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B17  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 18  | Riñón  | R18  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B18  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               | 19  | Riñón  | R19  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B19  | Sí  | Sí  | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | +  | +   |
|       |               | 20  | Riñón  | R20  | No  | No  |                             |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B20  | Sí  | Sí  | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | +  | +   |

| Lugar |               | Pez | Órgano | Cepa | TSA | GSP | Colonia               | Forma/Gram     | OX | CAT |
|-------|---------------|-----|--------|------|-----|-----|-----------------------|----------------|----|-----|
| PASCO | PISCIGRANJA 3 | 1   | Riñón  | R1   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B1   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               | 2   | Riñón  | R2   | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B2   | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 3   | Riñón  | R3   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B3   | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 4   | Riñón  | R4   | Sí  | No  | Circular, 1mm         | Cocos (+)      |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B4   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               | 5   | Riñón  | R5   | Sí  | No  | Circular, 1mm         | Cocos (+)      |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B5   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               | 6   | Riñón  | R6   | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B6   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               | 7   | Riñón  | R7   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B7   | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 8   | Riñón  | R8   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B8   | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 9   | Riñón  | R9   | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B9   | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               | 10  | Riñón  | R10  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B10  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       | PISCIGRANJA 4 | 11  | Riñón  | R11  |     |     |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B11  | Sí  | No  | Circular, 1mm         | Cocos (+)      |    |     |
|       |               | 12  | Riñón  | R12  | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B12  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 13  | Riñón  | R13  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B13  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 14  | Riñón  | R14  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B14  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 15  | Riñón  | R15  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B15  | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 16  | Riñón  | R16  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B16  | Sí  | No  | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 17  | Riñón  | R17  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B17  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               | 18  | Riñón  | R18  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B18  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               | 19  | Riñón  | R19  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               |     | Bazo   | B19  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |
|       |               | 20  | Riñón  | R20  | No  | No  |                       |                |    |     |
|       |               |     | Bazo   | B20  | Sí  | No  | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | -  | +   |

| Lugar     | Pez           | Órgano | Cepa  | TSA | GSP | Colonia | Forma/Gram                  | OX             | CAT |
|-----------|---------------|--------|-------|-----|-----|---------|-----------------------------|----------------|-----|
| CAJAMARCA | PISCIGRANJA 5 | 1      | Riñón | R1  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               |        | Bazo  | B1  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               | 2      | Riñón | R2  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               |        | Bazo  | B2  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | - + |
|           |               | 3      | Riñón | R3  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               |        | Bazo  | B3  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | - + |
|           |               | 4      | Riñón | R4  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               |        | Bazo  | B4  | Sí  | No      | Circular, 1mm               | Cocos (+)      |     |
|           |               | 5      | Riñón | R5  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas       | Cocobacilo (-) | - + |
|           |               |        | Bazo  | B5  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               | 6      | Riñón | R6  | Sí  | No      | Circular, 1mm               | Cocos (+)      |     |
|           |               |        | Bazo  | B6  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               | 7      | Riñón | R7  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               |        | Bazo  | B7  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               | 8      | Riñón | R8  | Sí  | No      | Circular, 2mm, cremas       | Cocobacilo (-) | - + |
|           |               |        | Bazo  | B8  | No  | No      |                             |                |     |
|           |               | 9      | Riñón | R9  | Sí  | Sí      | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | + + |
|           |               |        | Bazo  | B9  | Sí  | Sí      | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | + + |
|           |               | 10     | Riñón | R10 | Sí  | Sí      | Circular, 3mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | + + |
|           |               |        | Bazo  | B10 | No  | No      |                             |                |     |
|           |               | 11     | Riñón | R11 | No  | No      |                             |                |     |
|           |               |        | Bazo  | B11 | Sí  | Sí      | Circular, 2mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | + + |
|           |               | 12     | Riñón | R12 | No  | No      |                             |                |     |
|           |               |        | Bazo  | B12 | Sí  | Sí      | Circular, 3mm, blanquecinas | Cocobacilo (-) | + + |

| Lugar  | Pez           | Órgano | Cepa  | TSA | GSP | Colonia | Forma/Gram            | OX             | CAT |
|--------|---------------|--------|-------|-----|-----|---------|-----------------------|----------------|-----|
| ANCASH | PISCIGRANJA 6 | 1      | Riñón | R1  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               |        | Bazo  | B1  | Sí  | No      | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               | 2      | Riñón | R2  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               |        | Bazo  | B2  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               | 3      | Riñón | R3  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               |        | Bazo  | B3  | No  | No      |                       |                |     |
|        |               | 4      | Riñón | R4  | No  | No      |                       |                |     |
|        |               |        | Bazo  | B4  | Sí  | No      | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               | 5      | Riñón | R5  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               |        | Bazo  | B5  | Sí  | No      | Circular, 2mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               | 6      | Riñón | R6  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               |        | Bazo  | B6  | No  | No      |                       |                |     |
|        |               | 7      | Riñón | R7  | No  | No      |                       |                |     |
|        |               |        | Bazo  | B7  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               | 8      | Riñón | R8  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |
|        |               |        | Bazo  | B8  | Sí  | No      | Circular, 1mm, cremas | Cocobacilo (-) | - + |

### Anexo 3: Protocolo de PCR convencional

Antes de realizar la PCR se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Conservar la temperatura de los reactivos a usarse mediante un contenedor con hielo.
- Concentrar 50 ng/μl del ADN que se amplificará de las cepas presuntivas a *Aeromonas* spp., *A. salmonicida*, *A. hydrophila*.
- Preparar el Mix de PCR en un tubo de microcentrífuga de 2ml.

#### Componentes del Mix de PCR (23 μl de volumen final)\*

- GoTaq Green Master Mix, 2X 12,5 μl
- Forward Primer *Aeromonas* 2 μl (Concentración final de 10μM)
- Reverse Primer *Aeromonas* 2 μl (Concentración final de 10μM)
- Agua sin presencia de nucleasas 6,5 μl
- *Aeromonas* ADN 2 μl

(\*) Este esquema se repite para cada muestra a ser trabajada

#### Ejecución de la PCR:

1. Depositar 18 μl del Mix en microtubos para PCR
2. Adicionar 2 μl de ADN de muestra y mezclar mediante pipeteo
3. Cerrar los tubos adecuadamente para prevenir la evaporación
4. Colocar los tubos en el termociclador
5. El termociclador debe ser programado según:

| Proceso de la PCR         | Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|---------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 1                | 94               | 2            |
| Desnaturalización         | 40               | 94               | 40 s         |
| Alineamiento              |                  | 60               | 40 s         |
| Extensión                 |                  | 72               | 1            |
| Extensión final           | 1                | 72               | 10           |

6. Finalmente, los tamaños de bandas originados por los productos de PCR (tanto de *Aeromonas salmonicida* como de *Aeromonas hydrophila*) fueron observados empleándose electroforesis, para la cual se usó gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X, un campo eléctrico de 90 V/cm por 60 minutos y la tinción con 0,5 μg/ml de bromuro de etidio.